

機関番号：17102

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2008～2010

課題番号：20689030

研究課題名（和文） ミクログリア細胞においてP2X4受容体依存的に誘導される神経因性疼痛遺伝子の特定

研究課題名（英文） Neuropathic pain-related molecules regulated by P2X4R in microglia

研究代表者

津田 誠 (Makoto Tsuda)

九州大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：40373394

研究成果の概要（和文）：神経因性疼痛に重要な P2X4 受容体（P2X4R）依存的に発現する神経因性疼痛遺伝子を見出すことを目的に遺伝子発現解析を行い、P2Y12R やケモカイン類などを検出した。さらに、P2Y12R の疼痛における新しい役割と、ケモカイン受容体 CCR2 による P2X4R の細胞膜移行メカニズムを明らかにした。P2X4R による遺伝子発現および P2X4R の細胞膜輸送制御が疼痛の治療標的となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The aim of the present study was to identify microglial genes whose expression are regulated by P2X4Rs, a receptor crucial for neuropathic pain, and to investigate the role of these molecules in neuropathic pain. The present study found P2Y12 receptor and chemokines as the candidate genes. We also showed an important role of P2Y12 receptor in neuropathic pain and a new mechanism for P2X4R trafficking to the plasma membrane through the chemokine receptor CCR2. Thus, it is possible that targeting P2X4R-regulating genes and P2X4 trafficking may be new therapeutic strategy for treating neuropathic pain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2009年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2010年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
年度			
年度			
総計	19,600,000	5,880,000	25,480,000

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：疼痛管理学

1. 研究開始当初の背景

痛みは、身体に傷や何らかの障害が起きたことを生体に認識させる重要な警告信号である。しかし一方で、癌や糖尿病患者などで見られる神経障害性の慢性疼痛「神経因性疼痛」は、患者の QOL を極度に蝕み、原因疾患の治療にさえ多大な悪影響を及ぼすことから、適切なペインコントロールが必要とな

る。しかし、その発症機序には不明な点が多く、有効な治療法も確立されていないのが現状である。

近年、疼痛の発症維持に関わる様々な分子メカニズムが欧米主体で提唱されている中、我々は細胞外 ATP の膜受容体である ATP 受容体の研究を切り口として、その解明に取り組み、イオンチャネル内蔵型 ATP 受容体の一

つ「P2X4R」の発現レベルが、神経因性疼痛動物モデルの脊髄で著明に増加し、その受容体機能の抑制が疼痛の緩解を導くことを世界で初めて発見した (Nature, 2003)。特筆すべき点は、P2X4R 過剰発現細胞が、その当時疼痛メカニズムの主役であった神経細胞ではなく、役割が不明であったミクログリア細胞に局限していたことである。この成果は、ミクログリアで過剰発現した P2X4R の活動性が神経因性疼痛の発症維持に必須であるという日本オリジナルの独創的なアイデアを明示し、疼痛発症維持メカニズムの解明に大きな前進をもたらした。

その後、ミクログリア発現分子の役割に関する研究は全世界の注目を集め、今現在、熾烈な国際的研究競争が巻き起こっている。その中で、この日本発信型の革新的アイデアの発展には、ミクログリアにおける P2X4R の発現変化や機能に関する更なる研究が必須となる。最近、我々はミクログリアにおける P2X4R の過剰発現機構の一端を明らかにしている (Glia, 2006; Glia, 2008)。一方で、過剰発現した P2X4R の活性化による細胞応答に関しては不明な点が多い。そこで我々は、P2X4R のイオンチャネル特性である高いカルシウム透過能に着目し、「P2X4R の刺激により、液性因子などの放出という短期的な応答、さらには遺伝子発現を介する長期的な応答が誘発されるであろう」と考えた。そして最近、その短期的応答として、P2X4R 刺激後にミクログリアから脳由来神経栄養因子 BDNF が放出され、BDNF が脊髄後角ニューロンへ作用して異常興奮を引き起こすことを突き止めた (Nature, 2005)。

2. 研究の目的

上述のように、P2X4R 依存的な短期的応答は明らかにできたが、長期的応答については依然不明である。そこで本研究では、神経因性疼痛メカニズムの解明および治療薬標的分子の発見を目指すため、ミクログリア細胞において P2X4 受容体依存的に誘導される神経因性疼痛遺伝子の特定することを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

P2X4R 依存的誘導遺伝子の探索と特定は、P2X4R 欠損 (KO) マウスおよび野生型マウスを用いて神経因性疼痛モデルを作製し、それぞれの脊髄で発現変動する遺伝子を DNA マイクロアレイ等により解析した。神経因性疼痛にはミクログリアでの P2X4R の過剰発現が重要であるという我々の知見から、マイクロアレイで候補となった分子が P2X4R とどのような相互作用を有しているのかも生化学的に解析した。さらに、ミクログリア P2X4R 過剰発現 (Tg) マウスの作製にもチャ

レンジした。最後に、上記の解析により特定された遺伝子に関して、神経因性疼痛発症維持メカニズムにおける役割を解析した。

4. 研究成果

P2X4R 依存的に誘導される神経因性疼痛遺伝子を特定する目的で、まず、野生型 C57BL/6 マウスおよび P2X4R 欠損マウスの第 4 腰髄神経へ損傷を加え (神経因性疼痛モデル)、第 3~5 腰髄を摘出し、組織中に含まれている全 RNA を抽出した。その後、DNA マイクロアレイにより網羅的に解析した結果、野生型マウスの非損傷側脊髄に比較し、神経損傷側脊髄で遺伝子発現が 2 倍以上増加する分子を約 100 個検出できた。その中には、カテプシン S、P2Y12 受容体や Toll 様受容体 2 などの疼痛重要分子が含まれていた。さらに、P2X4R 欠損マウスで神経因性疼痛が抑制されることを明らかにし (Mol Pain 5, 28, 2009)、上記の野生型マウスと同様の DNA マイクロアレイ実験を神経損傷 P2X4R-KO マウスの脊髄由来 RNA を用いて検討した。野生型マウスの脊髄で発現増加する遺伝子群の中で、その増加が P2X4R 欠損マウスで抑制されている遺伝子として ATP 受容体ファミリーである P2Y12 受容体 (P2Y12R) とケモカイン類を見出した。脊髄における P2Y12R はミクログリア特異的に発現し、P2Y12R 拮抗薬の脊髄くも膜下腔内繰り返し投与および P2Y12R 欠損マウスでは、神経障害性疼痛形成の有意な抑制が認められた (J Neurosci, 28, 4949-4956, 2008)。さらに、一旦形成した疼痛に対しても P2Y12R 拮抗薬は有意な抑制効果を示した。P2Y12R はミクログリアの走化性に関与しているが、P2Y12R を抑制することで、ミクログリアの神経軸索に対する接触が抑制されることも新たに見出した (Glia 58, 1838-1846, 2010)。これらの成果は、P2X4R だけでなく、P2Y12R も神経因性疼痛に重要な役割を担っていることを初めて示唆するものとなった (Glia 57, 1469-1479, 2009; Brain Res Rev 63, 222-232, 2010)。さらに、野生型マウスと P2X4R 欠損マウス間で発現差異が認められた遺伝子としてケモカイン類の CCL12 や CCL7 も検出した。これらはいずれもケモカイン受容体 CCR2 の内因性リガンドであり、CCR2 は P2X4R と同様にミクログリアに発現し、神経障害性疼痛にも関与する。そこで、CCR2 刺激後に P2X4R 機能がどのように変化するのかを、P2X4R 依存的な Akt リン酸化応答を指標に検討したところ、CCR2 刺激ミクログリアで有意に Akt のリン酸化が亢進していた。さらに、ミクログリアの CCR2 刺激後に P2X4R タンパク質の細胞膜表面への発現が亢進することを見出した。この作用は CCR2 刺激後 30 分から認められ、従来我々が報告した P2X4R 遺伝子発現制御とは異なる

る,新しい P2X4R タンパク質制御機構の存在を示唆している。また,培養ミクログリア細胞に発現させた GFP 融合 P2X4R の動きをリアルタイムで測定したところ,CCR2 刺激細胞では GFP 蛍光粒子の動きが増加し,総移動距離が有意に亢進した。細胞内における P2X4R タンパク質はリソソームに存在しているが,CCR2 刺激によりリソソームと P2X4R タンパク質の細胞内分布の変化およびリソソーム酵素の放出が起こった。これら一連の成果から,CCR2 刺激によってリソソームが細胞膜へ融合し,結果として P2X4R の細胞膜での発現が亢進したものと考えられる(論文投稿中)。このことは,P2X4R の細胞内での動態制御が新しい疼痛治療に繋がる可能性を示唆している(Glia 57, 1469-1479, 2009; Brain Res Rev 63, 222-232, 2010)。さらに,他のケモカイン類の CCL21 がミクログリアで P2X4R の発現作用を有していることも明らかにできた(EMBO J in press, 2011)。

一方,ミクログリア P2X4R-Tg マウスでの研究において,Tg 作製のために使用する Iba1 プロモーターベクターで P2X4R の N 末端部分に Iba1 の Exon1 および Exon2 の一部が組み込まれてしまうことから,P2X4R の機能に影響及ぼしてしまう可能性を回避するため,この Exon 部分を除去した Iba1 プロモーターベクターを新たに作製した。そして,作製したベクターの発現特異性を確認し,胚 300 個にマイクロインジェクションを行った。遺伝子解析の結果,ファウンダーマウス 6 個体を得ることに成功した。さらに,P2X4R が帯状疱疹による疼痛に重要な役割を果たしていることを見出した。この結果は,より臨床に近い慢性疼痛モデルにおける P2X4R の重要性を示しており,P2X4R 拮抗薬が疼痛治療薬として有用であることを強く示唆するものである(特許出願済,論文作成中)。

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 27 件)

1. Biber K*, Tsuda M*, Tozaki-Saitoh H*, Tsukamoto K, Toyomitsu E, Masuda T, Boddeke H, Inoue K: Neuronal CCL21 up-regulates microglia P2X4 expression and initiates neuropathic pain development. EMBO J in press (2011) *these authors equally contribute to this work. 査読有

2. Tsuda M, Kohro Y, Yano T, Tsujikawa T, Kitano J, Tozaki-Saitoh H, Koyanagi S, Ohdo S, Ji RR, Salter MW, Inoue K: JAK-STAT3 pathway regulates spinal astrocyte proliferation

and neuropathic pain maintenance in rats. Brain 134:1127-1139 (2011) 査読有

3. Maeda M, Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, Kiyama H. Nerve injury-activated microglia engulf myelinated axons in a P2Y12 signaling-dependent manner in the dorsal horn. Glia 58: 1838-1846 (2010) 査読有

4. Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K. Pain and purinergic signaling. Brain Res Rev. 63: 222-232 (2010) 査読有

5. Shiratori M, Tozaki-Saitoh H, Yoshitake M, Tsuda M, Inoue K. P2X7 receptor activation induces CXCL2 production in microglia through NFAT and PKC/MAPK pathways. J Neurochem 114, 810-819 (2010) 査読有

6. Hasegawa S, Kohro Y, Shiratori M, Ishii S, Shimizu T, Tsuda M, Inoue K. Role of PAF receptor in proinflammatory cytokine expression in the dorsal root ganglion and tactile allodynia in a rodent model of neuropathic pain. PLoS ONE 5: e10467 (2010) 査読有

7. Tsuda M, Kuboyama K, Inoue T, Nagata K, Tozaki-Saitoh H, Inoue K: Behavioral phenotypes of mice lacking purinergic P2X4 receptors in acute and chronic pain assays. Mol Pain 5:28 (2009) 査読有

8. Masuda J, Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K: Intrathecal delivery of PDGF produces tactile allodynia through its receptors in spinal microglia. Mol Pain 5:23 (2009) 査読有

9. Tsuda M, Masuda T, Kitano J, Shimoyama H, Tozaki-Saitoh H, Inoue K: IFN- γ receptor signaling mediates spinal microglia activation driving neuropathic pain. Proc Natl Acad Sci USA 106(19):8032-8037 (2009) 査読有

10. Tsuda M, Toyomitsu E, Kometani M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K: Mechanisms underlying fibronectin-induced upregulation of P2X4R expression in microglia: distinct roles of PI3K-Akt and MEK-ERK signaling pathways. J Cell Mol Med 13(9b): 3251-3259 (2009) 査読有

11. Shinozaki Y, Sumitomo K, Tsuda M, Koizumi S, Inoue K, Torimitsu K: Direct observation of ATP-induced conformational changes in single P2X4 receptors. PLoS Biol 7(5): e103 (2009) 査読有

12. Inoue K, Tsuda M: Microglia and neuropathic pain. *Glia* 57(14):1469-79 (2009) 査読有

13. Nagata K, Imai T, Yamashita T, Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Inoue K: Antidepressants inhibit P2X4 receptor function: a possible involvement in neuropathic pain relief. *Mol Pain* 5:20 (2009) 査読有

14. Kataoka A, Tozaki-Saitoh H, Koga Y, Tsuda M, Inoue K: Activation of P2X7 receptors induces CCL3 production in microglial cells through transcription factor NFAT. *J Neurochem* 108(1): 115-125 (2009) 査読有

15. Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Miyata H, Ueda K, Kohsaka S, Inoue K: P2Y12 receptors in spinal microglia are required for neuropathic pain after peripheral nerve injury. *J Neurosci* 28: 4949-4956 (2008) 査読有

〔学会発表〕(計68件)

1. 津田誠, 脊髄ミクログリア細胞－神経因性疼痛の新しい治療薬開発ターゲットになり得るか?, 第25回日本整形外科学会基礎学術集会, 2010.10.14～15, 京都

2. 津田誠, 脊髄ミクログリア: 難治性慢性疼痛における重要な役者, *Neuro2010* (第33回日本神経科学大会、第53回日本神経化学会大会ならびに第20回日本神経回路学会大会), 2010.9.2, 神戸

3. 津田誠, グリア細胞を標的にした新しい鎮痛薬の可能性, 日本薬学会第130年, 2010.3.28, 岡山

4. 津田誠, ミクログリアと疼痛, 第52回日本神経化学会大会, 2009.6.24, 群馬

5. 津田誠, 難治性疼痛メカニズム解明への鍵となるミクログリア細胞, 第82回日本薬理学会年会, 2009.3.18, 横浜

6. 津田誠, 脊髄グリア細胞の役割から慢性痛のメカニズムを探る, 第38回日本慢性疼痛学会, 2009.2.27, 神戸

〔図書〕(計2件)

1. 津田誠, 井上和秀: 脊髄ミクログリアのATP受容体を介する新しい神経障害性疼痛メカニズム. 実践行動薬理学. 金芳堂. pp.224-232 (2010)

2. Toulme E, Tsuda M, Khakh BS, Inoue K: Chapter 10. On the role of ATP-gated P2X receptors in acute, inflammatory and neuropathic

pain. *Translational pain research from mouse to man*. CRC Press, pp235-249 (2009)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称: 帯状疱疹関連痛の急性期疼痛の予防又は治療剤

発明者: 井上和秀, 津田誠, 他

権利者: 九州大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-248173

出願年月日: 2010-11-5

国内外の別: 国内

〔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

津田 誠 (Makoto Tsuda)

九州大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号: 40373394