

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09227

研究課題名（和文）新しいミクログリア調節法を用いた侵害受容性体性感覚異常の分子基盤解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of nociceptive somatosensory disorders revealed by a novel regulatory method of microglia

研究代表者

木口 倫一（Kiguchi, Norikazu）

和歌山県立医科大学・薬学部・准教授

研究者番号：90433341

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、慢性疼痛および慢性掻痒におけるミクログリアの関与に着目した。各種病態モデルマウスを作製して解析を行ったところ、いずれも脊髄ミクログリアの活性化ならびに各種炎症性因子の発現増加が認められた。化学遺伝学的手法（DREADD）によりミクログリアを抑制的に制御すると、各種病態モデルマウスにおける痛み・痒みが抑制された。対照的に、ミクログリアを活性化させると、痛みが惹起されることも見出した。ミクログリアの操作によって生じるこれらの現象は、雄マウスにおいてのみ顕著に認められたことから、感覚異常における性に依存したミクログリアの病態生理学的役割の一端を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、痒みは痛みの弱いものであると理解されていたため、その神経化学的理解は痛み比べて大きく遅れていた。近年では、痛みと痒みは異なる感覚であると捉えられるようになったものの、それらが慢性化した際の病態調節機構の詳細は十分に明らかにされていなかった。本研究では、新しく確立したミクログリア特異的調節法を用いた解析によって、痛み・痒みの病態分子基盤の一端を担うミクログリアの役割を明らかにすることができた。生活の質を著しく損なう慢性疼痛、慢性掻痒に対し、新しい着眼点に基づく新規治療戦略の確立に繋がる成果であり、学術的・社会的意義は高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the involvement of microglia in chronic pain and pruritus. In various model mice suffering from chronic pain and itch, morphological activation of spinal microglia and upregulation of inflammatory factors were observed. Chemogenetic inhibition of spinal microglia by Gi-DREADD system suppressed pain- and itch-related behavior, while chemogenetic activation of spinal microglia by Gq-DREADD system elicited pain hypersensitivity in mice. Given that these phenomena induced by manipulation of spinal microglia were only observed in male but not female mice, we clarified that sex-dependent pathophysiological roles of microglia in somatosensory disorders.

研究分野：神経薬理学

キーワード：痛み 痒み 脊髄 ミクログリア 神経障害性疼痛 アロディニア 皮膚炎 DREADD

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

侵害受容性体性感覚(特に痛みと痒み)は外界の情報や生体の異常を察知するための警告系として必要不可欠であるが、それらが生理的範疇を超えて病的な状態に陥ると、耐え難い苦痛のため生活の質が著しく低下する。このような体性感覚異常に対しては既存の治療薬が奏功しないため、新しい着眼点に基づく新規治療薬の開発が求められている。近年、慢性疼痛における脊髄ミクログリアの役割が注目されており、我々も様々な病態におけるミクログリアの関与について研究を行ってきた。痒みの調節機構の理解は痛みと比較して大きく遅れていたが、我々は慢性搔痒モデルマウスの脊髄においてもミクログリアの活性化が生じることを見出した。しかし現在において、ミクログリアによる痒みの調節機構は明らかにされておらず、その病態生理学的役割の解明が求められている。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、慢性疼痛および慢性搔痒モデルマウスにおけるミクログリアの役割を明らかにすることである。まずは、各種病態モデルマウスにおけるミクログリアの活性化プロファイルを免疫組織化学解析や遺伝子発現解析から明らかにする。そして我々が樹立した Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs (DREADD) によるミクログリア特異的調節法を用い、ミクログリアを抑制性、または興奮性に操作した際の痛み・痒みに及ぼす影響を解析することによって、感覚異常に関わるミクログリアの特徴付けを行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) 慢性疼痛モデルマウス

イソフルラン麻酔下でマウスの坐骨神経を縫合糸で部分結紮する、または抗がん薬パクリタキセルを反復投与することによって、異なる種類の神経障害性疼痛モデルマウスを作製した。痛みの評価には、金網上で馴化させたマウスの後肢足底に屈曲圧の異なるフィラメントを一定の法則に従って押し当て、マウスが逃避反応を示すパターンをもとに機械的刺激に対する痛覚閾値を算出した。

#### (2) 慢性搔痒モデルマウス

頸背部を剃毛した後にジフェニルシクロプロペノン(DCP)またはイミキモド(IMQ)を反復塗布することによって、接触皮膚炎および乾癬のモデルマウスを作製した。痒みの評価には、マウスが後肢で頸背部を引っ掻く行動の回数を測定し、痒みの程度の指標とした。

#### (3) DREADD 発現マウス

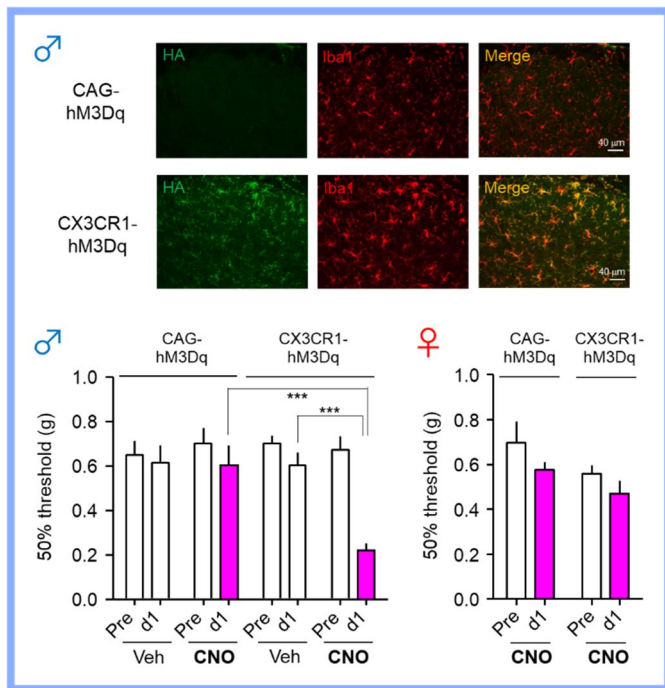
ミクログリア特異的な Cx3cr1 プロモーター制御下において、Cre 依存的に変異型ヒトムスカリン受容体 3 (hM3Dq) を発現する Gq-DREADD マウス (Cx3cr1-hM3Dq) または変異型ヒトムスカリン受容体 4 (hM4Di) を発現する Gi-DREADD マウス (Cx3cr1-hM4Di) を作製した。これらのマウスに選択的リガンドである Clozapine-N-Oxide (CNO) を全身または局所投与し、ミクログリアを領域特異的に抑制または興奮させた際の影響を、行動解析、免疫組織化学解析、遺伝子発現解

析等によって評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 慢性疼痛とミクログリア

ミクログリア特異的に Gq-または Gi-DREADD をそれぞれ誘導した際のミクログリア活性および痛覚閾値に及ぼす影響を評価した。Cx3cr1-hM3Dq マウスの脊髄くも膜下腔内 (i.t.) に CNO を投与して Gq-DREADD を誘導すると、足底へのフィラメント刺激に対する逃避閾値が低下し、機械的アロディニアが惹起された。また Gq-DREADD により、脊髄ミクログリアの形態学的活性化ならびに炎症性メディエーターの発現増加が観察された。一方、坐骨神経部分結紮ならびに抗がん薬誘発性の神経障害性疼痛モデルマウスに CNO を i.t. 投与して Gi-DREADD を誘導すると、機械的アロディニアが抑制されることも明らかになった。また重要な点として、Gq-および Gi-DREADD によるこれらの疼痛調節効果は雄マウスでのみ顕著に認められたが、雌マウスではその程度が弱く、明確な性差の存在が強調された。



##### (2) 慢性搔痒とミクログリア

DCP 処置による接触皮膚炎や IMQ 処置による乾癬モデルマウスを用い、慢性搔痒におけるミクログリアの関与を評価した。これらの病態下では、Iba1 抗体を用いた免疫組織化学染色によってミクログリアの形態学的活性化が認められ、さらに定量的 PCR 解析によって炎症性サイトカイン・ケモカインの発現が増加することを見出した。特に IMQ 処置によるミクログリアの活性化は他のモデルと比較して顕著であり、活性化の指標となる分子 (CD68、TLR4、IRF5 など) もそれを裏付けるように増加していた。CNO の i.t. 投与によって Gi-DREADD を誘導すると、IMQ 処置による引っ掻き行動が部分的に抑制されたことから、慢性疼痛と同様に、慢性搔痒の増悪にもミクログリアが関与する可能性が示唆された。

##### (3) ミクログリアの特性評価

網羅的解析によって、活性化ミクログリアにおける遺伝子発現プロファイルは慢性疼痛と慢性搔痒でそれぞれ異なることが確認された。痛みと痒みにそれぞれ関わるミクログリアの差別化を目的として、脊髄後角における各種遺伝子発現レベルを比較し、痛みと痒みの病態モデルそれぞれで特異的に発現増加する因子を同定した。これらの因子はいずれも活性化ミクログリアに発現することを確認しており、今後その詳細な機能解析によって侵害受容性体性感覚の分子基盤解明に繋がることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 6件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ding H, Kiguchi N, Mabry KM, Kishioka S, Ko MC.	4. 巻 223
2. 論文標題 Functional consequences of short-term exposure to opioids versus cannabinoids in nonhuman primates.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuropharmacology	6. 最初と最後の頁 109328
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuropharm.2022.109328.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Imado E, Sun S, Abawa AR, Tahara T, Kochi T, Huynh TNB, Asano S, Hasebe S, Nakamura Y, Hisaoka-Nakashima K, Kotake Y, Irifune M, Tsuga K, Takuma K, Morioka N, Kiguchi N, Ago Y.	4. 巻 160
2. 論文標題 Prenatal exposure to valproic acid causes allodynia associated with spinal microglial activation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurochem Int	6. 最初と最後の頁 105415
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuint.2022.105415.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kiguchi N, Ko MC.	4. 巻 93
2. 論文標題 Potential therapeutic targets for the treatment of opioid abuse and pain.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Adv Pharmacol	6. 最初と最後の頁 335-371
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/bs.apha.2021.09.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kiguchi N, Ding H, Park SH, Mabry KM, Kishioka S, Shiozawa Y, Alfonso Romero-Sandoval E, Peters CM, Ko MC.	4. 巻 198
2. 論文標題 Functional roles of neuromedin B and gastrin-releasing peptide in regulating itch and pain in the spinal cord of nonhuman primates.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem Pharmacol	6. 最初と最後の頁 114972
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bcp.2022.114972.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ding H, Trapella C, Kiguchi N, Hsu FC, Calo G, Ko MC.	4. 巻 135
2. 論文標題 Functional Profile of Systemic and Intrathecal Cebranopadol in Nonhuman Primates.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anesthesiology	6. 最初と最後の頁 482-93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/ALN.0000000000003848	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kiguchi N, Fukazawa Y, Saika A, Uta D, Saika F, Nakamura TY, Ko MC, Kishioka S.	4. 巻 9
2. 論文標題 Chemogenetic activation of central gastrin releasing peptide expressing neurons elicits itch related scratching behavior in male and female mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmacol Res Perspect	6. 最初と最後の頁 e00790
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/prp2.790	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Saika F, Matsuzaki S, Kishioka S, Kiguchi N.	4. 巻 10
2. 論文標題 Chemogenetic Activation of CX3CR1-Expressing Spinal Microglia Using Gq-DREADD Elicits Mechanical Allodynia in Male Mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 874-874
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10040874	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kiguchi N, Saika F, Fukazawa Y, Matsuzaki S, Kishioka S.	4. 巻 40
2. 論文標題 Critical role of GRP receptor-expressing neurons in the spinal transmission of imiquimod-induced psoriatic itch.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacol Rep	6. 最初と最後の頁 287-290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/npr2.12120.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Saika F, Matsuzaki S, Kobayashi D, Ideguchi Y, Nakamura TY, Kishioka S, Kiguchi N.	4. 巻 11
2. 論文標題 Chemogenetic Regulation of CX3CR1-Expressing Microglia Using Gi-DREADD Exerts Sex-Dependent Anti-Allodynic Effects in Mouse Models of Neuropathic Pain.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Pharmacol	6. 最初と最後の頁 925
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2020.00925.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ding H, Kiguchi N, Perrey DA, Nguyen T, Czoty PW, Hsu FC, Zhang Y, Ko MC.	4. 巻 125
2. 論文標題 Antinociceptive, reinforcing, and pruritic effects of the G-protein signalling-biased mu opioid receptor agonist PZM21 in non-human primates.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Br J Anaesth	6. 最初と最後の頁 596-604
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bja.2020.06.057.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

[学会発表] 計11件(うち招待講演 4件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 木口倫一, 雑賀史浩, 波多野裕, 日野信次朗, 鈴木堅太郎
2. 発表標題 脊髄ミクログリアの性差はアンドロゲンによって決定される
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会・第43回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木口倫一, 雑賀史浩, 波多野裕, 日野信次朗, 鈴木堅太郎
2. 発表標題 脊髄ミクログリアの性差形成におけるアンドロゲンシグナルの関与
3. 学会等名 第142回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木口倫一, 波多野裕, 雑賀史浩, 日野信次朗, 鈴木堅太郎
2. 発表標題 脊髄ミクログリアの性差に及ぼすアンドロゲンの影響
3. 学会等名 第141回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木口倫一
2. 発表標題 GRPによる霊長類のかゆみ調節機構
3. 学会等名 環境医学研究所・順天堂かゆみ研究センター第8回学術シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木口倫一
2. 発表標題 安全に使用できる新しいオピオイド鎮痛薬の可能性
3. 学会等名 第40回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木口倫一
2. 発表標題 ミクログリアの性差と神経障害性疼痛
3. 学会等名 痛みの研究会2021(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木口倫一, 雑賀史浩
2. 発表標題 脊髄ミクログリアによる性依存的なアロディニア誘発作用
3. 学会等名 第43回日本疼痛学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木口倫一, 鈴木堅太郎
2. 発表標題 痛みの増悪における脊髄ミクログリアの性依存的な役割
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木口倫一, 鈴木堅太郎
2. 発表標題 神経障害性疼痛モデルマウスに及ぼすミクログリア阻害薬PLX3397の性依存的な抑制効果
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 雑賀史浩, 木口倫一, 松崎伸介, 西谷友重
2. 発表標題 Gi/Gq DREADDを用いた脊髄ミクログリアの操作による性依存的な疼痛制御機構
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 木口倫一
2. 発表標題 ノシセプチン受容体を標的とする新規オピオイド化合物の薬効評価
3. 学会等名 第138回日本薬理学会近畿部会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	歌 大介  (Uta Daisuke)  (70598416)	富山大学・学術研究部薬学・和漢系・准教授   (13201)	
研究分担者	雑賀 史浩  (Saika Fumihiro)  (10644099)	和歌山県立医科大学・薬学部・客員研究員   (24701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	Wake Forest School of Medicine		