

課題番号	LS093
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成24年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	ミクログリア転写因子 IRF8 を切り口にした慢性疼痛メカニズムの解明
研究機関・ 部局・職名	九州大学・大学院薬学研究院・准教授
氏名	津田 誠

1. 当該年度の研究目的

本研究は、慢性疼痛における転写因子 IRF8 とそれによって発現制御された分子群の役割から、慢性疼痛メカニズムの解明を目標としている。H23年度は神経障害後にミクログリア特異的に発現増加する IRF8 が疼痛の発症および維持に重要な役割を有し、神経障害性疼痛に関連するミクログリア分子の発現が IRF8 欠損によって著明に抑制されることを明らかにした。さらに、IRF8 によって他の転写因子の発現も制御されるという結果をもとに、H24年度は、まず IRF8 が他の転写因子の発現を制御し、最終的にミクログリアの活性化状態および神経障害性疼痛を成立させる「マスター因子」としての可能性を検討した。さらに、IRF8 によるミクログリア細胞の機能の変化についても培養細胞および個体レベルでの解析を行った。

2. 研究の実施状況

IRF8 により発現が変動する他の転写因子として同じ IRF ファミリーの IRF5 を特定した。IRF5 の発現は、IRF8 を過剰発現したミクログリア細胞で増加し、機能喪失型 IRF8 ではその増加は起こらなかった。また、クロマチン免疫沈降(ChIP)-PCR 法により、IRF5 プロモーター領域へ IRF8 の結合も確認できた。神経障害疼痛モデルマウスの脊髄において、IRF5 mRNA およびタンパク質の発現は著明に増加し、その発現タイムコースは IRF8 と酷似していた。また、in situ hybridization-免疫組織染色法によって、IRF5 の発現細胞はミクログリア特異的であることも明らかにした。さらに、神経損傷後の脊髄における IRF5 の発現増加が IRF8 欠損マウスで消失していたことから、IRF5 の発現は IRF8 によって制御されていることが示唆された。また、IRF5 siRNA を脊髄くも膜下腔内へ投与し、IRF5 発現をノックダウンすることで、神経損傷による疼痛が有意に抑制された。以上の結果は、IRF8 を起点とした転写因子カスケードがミクログリアの活性化状態と神経障害性疼痛を成立させるという新たな可能性を示している。

IRF8 によるミクログリア細胞機能の変化を解析するため、野生型と IRF8 欠損マウスから調製したミクログリア培養細胞の遊走活性を検討したところ、IRF8 欠損ミクログリアで ATP に対する走化性が抑制されていた。さらに、個体レベルで解析するため、ミクログリアを可視化した(ミクログリアで EGFP を発現)IRF8 ヘテロ欠損マウスを新たに作成してミクログリアの突起運動について二光子顕微鏡を用いて検討した。その結果、レーザー照射による局所損傷に応答した突起運動が IRF8 ヘテロ欠損によって有意に抑制されることを突き止めた。また、これらの運動性に重要な P2Y12 受容体の発現も IRF8 の欠損で著明に低下していた。IRF8 がミクログリア細胞の機能制御に非常に大きな影響力を有していることを明らかにした。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計11件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計10件 Michio Nakaya, Mitsuru Tajima, Hidetaka Kosako, Takeo Nakaya, Akiko Hashimoto, Kenji Watari, Hiroaki Nishihara, Mina Ohba, Shiori Komiya, Naoki Tani, Motohiro Nishida, Hisaaki Taniguchi, Yoji Sato, Mitsuru Matsumoto, Makoto Tsuda, Masahiko Kuroda, Kazuhide Inoue, Hitoshi Kurose: GRK6 deficiency in mice causes autoimmune disease due to impaired apoptotic cell clearance. <i>Nature Communications</i> 4: 1532 (2013). Makoto Tsuda#, Takahiro Masuda, Hidetoshi Tozaki-Saitoh, Kazuhide Inoue: Microglial regulation of neuropathic pain. <i>Journal of Pharmacological Sciences</i> 121(2): 89-94 (2013). #Corresponding authors Makoto Tsuda, Simon Beggs, Michael W. Salter, Kazuhide Inoue: Microglia and intractable chronic pain. <i>Glia</i> 61(1): 55-61 (2013). Tatsuhiro Igawa, Sadayuki Higashi, Yoshito Abe, Takatoshi Ohkuri, Hiroyuki Tanaka, Satoshi Morimoto, Tomohiro Yamashita, Makoto Tsuda, Kazuhide Inoue, Tadashi Ueda: Preparation and characterization of a monoclonal antibody against the refolded and functional extracellular domain of rat P2X4 receptor. <i>The Journal of Biochemistry</i> 153(3): 275-282 (2013). Hideaki Muratake, Ai Ito, Takahiro Toda, Hideyuki Suzuki, Hiroshi Fukasawa, Makoto Tsuda, Kazuhide Inoue, Kiyoshi Sugiyama, Koichi Shudo: (R)- and (S)-4-Amino-3-(trimethylsilyl)methylbutanoic acids ameliorate neuropathic pain without central nervous system-related side effects. <i>Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters</i> 22(24): 7602-7604 (2012). Kazuhide Inoue, Makoto Tsuda: P2X4 receptors of microglia in neuropathic pain. <i>CNS & Neurological Disorders - Drug Targets</i> 11(6): 699-704 (2012). Li Sun1, Zhou Wu, Yoshinori Hayashi, Christoph Peters, Makoto Tsuda, Kazuhide Inoue, Hiroshi Nakanishi: Microglial cathepsin B contributes to the initiation of peripheral inflammation-induced chronic pain. <i>The Journal of Neuroscience</i> 32(33): 11330-11342 (2012). Takahiro Masuda*, Makoto Tsuda*, Ryohei Yoshinaga, Hidetoshi Tozaki-Saitoh, Keiko Ozato, Tomohiko Tamura, Kazuhide Inoue#: IRF8 is a critical transcription factor for transforming microglia into a reactive phenotype. <i>Cell Reports</i> 1, 334-340 (2012). *Equal contributors, #Corresponding authors Ayumi Uesugi, Ayako Kataoka, Hidetoshi Tozaki-Saitoh, Yui Koga, Makoto Tsuda, Bernard Robaye, Jean-Marie Boeynaems, Kazuhide Inoue: Involvement of protein kinase D in uridine diphosphate-induced microglial macropinocytosis and phagocytosis. <i>Glia</i> 60: 1094-1105 (2012) Emika Toyomitsu*, Makoto Tsuda*, Tomohiro Yamashita, Hidetoshi Tozaki-Saitoh, Yoshitaka Tanaka, Kazuhide Inoue: CCL2 promotes P2X4 receptor trafficking to the cell surface of microglia. <i>Purinergic Signalling</i> 8: 301-310 (2012) *Equal contributors</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計1件 井上和秀, 津田誠, 齊藤秀俊: 末梢神経損傷による神経障害性疼痛とグリア。 <i>Brain and Nerve</i> 64: 1233-1239 (2013)</p> <p>(未掲載) 計0件</p>
<p>会議発表 計34件</p>	<p>専門家向け 計33件 <シンポジウム等> 齊藤秀俊, 津田誠, 山下智大, 井上和秀 「P2X4 受容体のマイクログリア膜トラフィック制御」 第86回日本薬理学会年会(福岡, 2013.3.21-23) 九州大学 Makoto Tsuda, Takahiro Masuda, Kazuhide Inoue 「Spinal cord microglia in neuropathic pain signaling」 11th Biennial Meeting of Asian Pacific Society for Neurochemistry and 55th Meeting of Japanese Society for Neurochemistry (神戸, 2012.9.30-10.2) 自然科学研究機構 生理学研究所 津田誠, 井上和秀 「活性化マイクログリアの転写制御と神経障害性疼痛」 第35回日本神経科学大会 Neuro2012(名古屋, 2012.9.18-21) 名古屋大学 津田誠, 井上和秀 「Neuropathic pain: 新たな病態解明と画期的新薬の開発をめざして」(キーノートレクチャー) 第23回日本末梢神経学会学術集会(福岡, 2012.8.31-9.1) 九州大学 Makoto Tsuda, Takahiro Masuda, Hidetoshi Tozaki-Saitoh, Kazuhide Inoue 「Transcriptional regulation of P2X4R and neuropathic pain」 Purine 2012 (福岡, 2012.5.31-6.2) 九州大学</p>

Hidetoshi Tozaki-Saitoh, Emika Toyomitsu, Makoto Tsuda, Tomohiro, Yamashita, Yoshitaka Tanaka, Kazuhide Inoue 「CCL2 promotes P2X4 receptor trafficking to the cell surface of microglia」 Purine 2012 (福岡, 2012.5.31-6.2) 九州大学

津田誠 「デュロキセチンの神経障害性疼痛抑制メカニズムを考える」 第 53 回日本神経学会学術大会(東京, 2012.5.22~25) 慶應義塾大学

<一般演題>

津田誠, 増田隆博, 吉永遼平, 岩本祥佑, 田村智彦, 井上和秀 「ミクログリアでの P2X4 受容体発現と神経障害性疼痛における IRF 転写因子ネットワークの役割」 日本薬学会第 133 回年会 (横浜, 2013.3.27-30) 東京大学

高露雄太, 津田誠, 坂口瑛美, 齊藤秀俊, 岡野栄之, 井上和秀 「アストロサイト特異的 STAT3 欠損マウスでは神経損傷後のアストロサイトの活性化と神経障害性疼痛が抑制される」 日本薬学会第 133 回年会 (横浜, 2013.3.27-30) 東京大学

齊藤秀俊, 津田誠, 井上和秀 「転写因子 MafB はミクログリアの活性化過程を調節し神経障害性疼痛に関与する」 日本薬学会第 133 回年会 (横浜, 2013.3.27-30) 東京大学

山下智大, 津田誠, 齊藤秀俊, 井上和秀 「ミクログリアの細胞膜 P2X4 受容体の発現制御に対する P2X7 受容体の関与」 日本薬学会第 133 回年会 (横浜, 2013.3.27-30) 東京大学

高露雄太, 津田誠, 坂口瑛美, 齊藤秀俊, 岡野栄之, 井上和秀 「アストロサイト特異的 STAT3 欠損は神経損傷後のアストロサイト活性化および神経障害性疼痛を抑制する」(年会優秀発表賞) 第 86 回日本薬理学会年会(福岡, 2013.3.21-23) 九州大学

小嶋ちなみ, 齊藤秀俊, 津田誠, 井上和秀 「CCL21 による脊髄ミクログリアの MafB 発現誘導」 第 86 回日本薬理学会年会(福岡, 2013.3.21-23) 九州大学

川田竜, 齊藤秀俊, 増田隆博, 津田誠, 井上和秀 「転写因子 MafB は末梢神経損傷後の神経障害性疼痛発症に寄与する」 第 86 回日本薬理学会年会(福岡, 2013.3.21-23) 九州大学

山下智大, 長谷川あゆみ, 富永桂子, 上加世田紗和子, 張佳明, 津田誠, 齊藤秀俊, 井上和秀 「スクリーニングシステムを利用した P2X4 受容体を標的とした鎮痛薬の探索」 第 86 回日本薬理学会年会(福岡, 2013.3.21-23) 九州大学

赤木貴紀, 津田誠, 増田隆博, 齊藤秀俊, 田村智彦, 井上和秀 「線維筋痛症モデルマウスで発症するアロディニアにおける IRF8 の役割」 第 86 回日本薬理学会年会(福岡, 2013.3.21-23) 九州大学

増田隆博, 津田誠, 吉永遼平, 岩本祥佑, 西山晃, 西本奈央, 齊藤秀俊, 田村智彦, 井上和秀 「IRF8-IRF5 軸は神経障害性疼痛発現を担う P2X4 受容体高発現ミクログリアを誘導する」 第 86 回日本薬理学会年会(福岡, 2013.3.21-23) 九州大学

岩本祥佑, 増田隆博, 西本奈央, 田村智彦, 津田誠, 井上和秀 「IRF8 発現活性化ミクログリアにおける IRF1 を介した IL-1 β の発現誘導」 第 86 回日本薬理学会年会(福岡, 2013.3.21-23) 九州大学

西本奈央, 増田隆博, 富山大輔, 吉永遼平, 田村智彦, 齊藤秀俊, 津田誠, 井上和秀 「転写因子 IRF8 欠損による ATP 誘発ミクログリアケモタキシスの抑制」 第 86 回日本薬理学会年会(福岡, 2013.3.21-23) 九州大学

落石龍太郎, 津田誠, 永田健一郎, 矢野貴之, 井上智之, 齊藤秀俊, 井上和秀 「パクリタキセル誘発慢性疼痛における脊髄内 CCL3 の関与」 第 86 回日本薬理学会年会(福岡, 2013.3.21-23) 九州大学

坂口瑛美, 津田誠, 高露雄太, 齊藤秀俊, 岡野栄之, 井上和秀 「細胞種特異的 STAT3 欠損マウスを用いた神経障害性疼痛の解析」(優秀発表賞) 第 65 回日本薬理学会西南部会(熊本, 2012.11.23) 熊本大学

赤木貴紀, 津田誠, 井上裕雅, 南絵美子, 井上和秀 「線維筋痛症モデルにおけるミクログリア活性化とその役割」 第 65 回日本薬理学会西南部会(熊本, 2012.11.23) 熊本大学

Hidetoshi Tozaki-Saitoh, Junya Masuda, Makoto Tsuda, Kazuhide Inoue 「Transcription factor MafB mediates activation process of spinal microglia that contributes to neuropathic pain development」 第 55 回日本神経化学学会大会(APS/N/JSN 2012)(神戸, 2012.9.30-10.2) 自然科学研究機構 生理学研究所

Tomohiro Yamashita, Makoto Tsuda, Hidetoshi Tozaki-Saitoh, Kazuhide Inoue 「Role of P2X7 receptors in regulation of P2X4 receptors expression on the plasma membrane of microglia」 第 55 回日本神経化学学会大会(APS/N/JSN 2012)(神戸, 2012.9.30-10.2) 自然科学研究機構 生理学研究所

Takahiro Masuda, Makoto Tsuda, Ryohei Yoshinaga, Tomohiko Tamura, Kazuhide Inoue 「IRF5 is required for IRF8-derived microglial activation and contributes to neuropathic pain」 第 55 回日本神経化学学会大会(APS/N/JSN 2012)(神戸, 2012.9.30-10.2) 自然科学研究機構 生理学研究所

村田祐造, 八坂敏一, 原博満, 李明子, 藤田亜美, 津田誠, 井上和秀, 熊本栄一, 吉田裕樹, 増子貞彦 「DAP12 および CARD9 ノックアウトマウスによる神経障害痛モデルの組織学的検討」 第 35 回日本神経科学大会 Neuro2012(名古屋, 2012.9.18-21) 名古屋大学

増田隆博, 津田誠, 田村智彦, 井上和秀 「IRF ファミリー転写因子群によるミクログリア遺伝子の発現制御と神経障害性疼痛」 第 34 回日本疼痛学会(熊本, 2012.7.20-21) 佐賀大学

様式19 別紙1

	<p>山下智大, 津田誠, 齊藤秀俊, 井上和秀 「活性化ミクログリア細胞での P2X7 受容体による P2X4 受容体の細胞膜表面における発現レベルの調節」 第 34 回日本疼痛学会(熊本, 2012.7.20-21) 佐賀大学</p> <p>Takahiro Masuda, Makoto Tsuda, Ryohei Yoshinaga, Nao Nishimoto, Shosuke Iwamoto, Hidetoshi Tozaki-Saitoh, Tomohiko Tamura, Kazuhide Inoue 「IRF Family Transcription Factor Axis Governs Gene Expression Program in Microglia Gating Neuropathic Pain」(Poster Award 受賞) Purine 2012 (福岡, 2012.5.31-6.2) 九州大学</p> <p>Ayumi Uesugi, Ayako Kataoka, Hidetoshi Tozaki-Saitoh, Makoto Tsuda, Kazuhide Inoue 「Involvement of Protein Kinase D in UDP-Induced Microglial Macropinocytosis and Phagocytosis」 Purine 2012 (福岡, 2012.5.31-6.2) 九州大学</p> <p>Tomohiro Yamashita, Makoto Tsuda, Hidetoshi Tozaki-Saitoh, Kazuhide Inoue 「Role of P2X7 Receptors in Regulation of P2X4 Receptors Expression on the Plasma Membrane of Microglia」 Purine 2012 (福岡, 2012.5.31-6.2) 九州大学</p> <p>Takahiro Masuda, Makoto Tsuda, Ryohei Yoshinaga, Hidetoshi Tozaki-Saitoh, Keiko Ozato, Tomohiko Tamura, Kazuhide Inoue 「IRF8 is a critical transcription factor required for transforming microglia into a reactive phenotype after nerve injury」 42th Annual Meeting Society for Neuroscience (New Orleans, 2012.10.13-17)</p> <p>Makoto Tsuda, Takahiro Masuda, Ryohei Yoshinaga, Hidetoshi Tozaki-Saitoh, Keiko Ozato, Tomohiko Tamura, Kazuhide Inoue 「IRF8 is a critical transcription for transforming microglia into a reactive phenotype」 (Best Poster Award 受賞) The 7th International Conference of Neurons and Brain Diseases (Montreal, 2012.6.26-28)</p> <p>一般向け 計1件 津田誠 「慢性疼痛におけるミクログリア転写因子 IRF8 の役割」 九州大学高等研究院若手研究者交流セミナー(福岡, 2012.11.21) 九州大学</p>
<p>図書 計0件</p>	
<p>産業財産権 出願・取得状況 計0件</p>	<p>(取得済み) 計0件 (出願中) 計0件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>薬学研究院: http://www.phar.kyushu-u.ac.jp/ 薬理学分野: http://yakkou.phar.kyushu-u.ac.jp/</p>
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<p>平成 24 年 11 月 21 日に九州大学医学部百年講堂で開催された「九州大学高等研究院若手研究者交流セミナー」にて本研究成果を「慢性疼痛におけるミクログリア転写因子 IRF8 の役割」というタイトルで IRF8 が神経障害後の慢性疼痛に非常に重要な役割を果たしていることを一般市民および研究者へ発表した(参加者約50名)。</p>
<p>新聞・一般雑誌等掲載 計18件</p>	<p>日本経済新聞(2012. 4. 6 朝刊 34 面)「がん・糖尿病で神経障害 激痛の原因物質特定 九大」 毎日新聞(2012. 4. 6 朝刊 26 面)「神経障害性疼痛 治療に光 九大薬学研究院 原因たんぱく質特定」 読売新聞(2012. 4. 6 朝刊 29 面)「神経障害性疼痛の原因特定 脊髄内たんぱく質が誘導 九大グループ」 朝日新聞(2012. 4. 6 朝刊 33 面)「神経性激痛 主犯格みつけた 九大が特定 既存薬で抑制へ前進」 西日本新聞(2012. 4. 6 朝刊 33 面)「神経障害性疼痛 仕組みを解明 九大グループ 治療薬開発へ期待」 日経産業新聞(2012. 4. 6 朝刊 10 面)「慢性の激痛 「鍵」発見 脳・脊髄の細胞内で生成 九大など」 毎日 jp(2012. 4. 6 02:35), Yahoo! JAPAN ニュース(2012. 4. 6 2:36), Excite ニュース(2012. 4. 6 8:51) 「神経障害性疼痛:原因たんぱく質を特定、治療に光 九州大」 http://mainichi.jp/select/news/20120406k0000m040133000c.html http://headlines.yahoo.co.jp/hl?a=20120406-00000013-mai-soci 日本経済新聞(2012. 4. 6 03:00)「がん・糖尿病で神経損傷、激痛の原因物質特定 九大など」 http://www.nikkei.com/news/category/article/g=96958A9C889DE6E2E0E2E7E0E1E2E2E4E2E6E0E2E3E09180EAE2E2E2;at=DGXZZO0195579008122009000000 YOMIURI ONLINE(2012. 4. 6)「難治性疼痛新薬へ一歩、たんぱく質の関与特定」</p>

様式19 別紙1

	<p> http://kyushu.yomiuri.co.jp/news/national/20120406-OYS1T00202.htm マイナビニュース(2012. 4. 6), Yahoo! JAPAN ニュース(2012. 4. 6 18:10), Infoseek 楽天ニュース(2012. 4. 6 17:10), Goo ニュース(2012. 4. 6 17:30) 「九大など、神経障害性疼痛が引き起こされる仕組みを解明」 http://news.mynavi.jp/news/2012/04/06/103/ http://headlines.yahoo.co.jp/hl?a=20120406-00000059-mycomj-sci http://news.infoseek.co.jp/article/06mycom20120406p99 msn 産経ニュース(2012. 4. 6 03:01)「「神経障害性疼痛」の原因物質を解明、九大チーム」 http://sankei.jp.msn.com/science/news/120406/scn12040603020000-n1.htm SciencePortal(2012. 4. 6)「痛みの原因物質を特定」 http://scienceportal.jp/news/daily/1204/1204062.html 福島民報(2012. 4. 6 03:00)「原因物質解明、九大チーム 「神経障害性疼痛」」 http://www.minpo.jp/view.php?pageId=21082&mode=0&classId=&blockId=9959084&newsMode=article </p>
<p>その他</p>	<p>該当なし</p>

4. その他特記事項

なし

実施状況報告書(平成24年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	121,000,000	51,900,000	34,200,000	34,900,000	0
間接経費	36,300,000	15,570,000	10,260,000	10,470,000	0
合計	157,300,000	67,470,000	44,460,000	45,370,000	0

2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	17,683	34,200,000	0	34,217,683	34,159,602	58,081	0
間接経費	5,305	10,260,000	0	10,265,305	10,262,502	2,803	0
合計	22,988	44,460,000	0	44,482,988	44,422,104	60,884	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	27,790,337	共焦点レーザースキャン顕微鏡アップグレード、リアルタイムPCR、冷却遠心機、試薬、実験器材、動物等
旅費	1,627,453	研究成果発表旅費等
謝金・人件費等	490,481	短期雇用職員(実験動物飼育ケージ等清掃)人件費等
その他	4,251,331	動物飼育費用、受託解析料、学会参加費等
直接経費計	34,159,602	
間接経費計	10,262,502	
合計	44,422,104	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
共焦点レーザースキャン顕微鏡LSM700アップグレード	独国カルツアイスマイクロスコープ社製	1	11,833,500	11,833,500	平成24/10/29	九州大学
リアルタイムPCR装置 Light Cycler96 インストール メント-D	独国ロシュ・ダイアグノスティクス社製 581591D	1	3,150,000	3,150,000	平成25/1/24	九州大学
冷却遠心機	独国エッペントルフ社製 5702R	1	646,800	646,800	平成24/10/5	九州大学