

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23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。神経損傷後に IRF8 がミクログリア特異的に発現増加し、IRF8 欠損マウスで神経障害性疼痛が抑制されたという H22年度の結果をもとに、H23年度は神経障害性疼痛の維持過程における役割、IRF8 による発現制御遺伝子の探索、さらに IRF8 によるミクログリア細胞機能の変化を明らかにすることを目的として研究を行った。

2. 研究の実施状況

神経損傷による IRF8 の発現増加は持続的であることから、一旦形成した疼痛の維持過程にも関与する可能性を検討した。神経損傷後 5 日目から IRF8 siRNA を脊髄くも膜下腔内へ投与し、IRF8 発現増加を抑制したところ、疼痛が有意に緩解した。したがって、IRF8 は神経障害性疼痛の発症と維持に重要な役割を担っていることが明らかとなった。一方で、IRF8 を欠損しても生理的な疼痛反応はほぼ正常で、組織炎症による持続的な疼痛も影響がないことから、IRF8 は神経障害性疼痛に対して特に重要であると思われる。神経損傷後のミクログリアは細胞増殖、さらに様々な遺伝子を発現して細胞活動を高めていく。IRF8 欠損マウスでは、ミクログリアの増殖は起こるが、神経障害性疼痛を起こすミクログリア遺伝子群 (TLR2, P2X4, P2Y12R, IL-1 $\beta$  や CatS など) の発現が低下していた。これらの遺伝子発現の増加は IRF8 を過剰発現したミクログリア培養細胞でも再現できた。以上の結果より、IRF8 は神経損傷後に脊髄ミクログリア特異的に増加し、多くのミクログリア分子をまとめて調節して、疼痛を起こすミクログリアの過度の活性化状態を導く、いわば「活性化スイッチ」のような役割をしていることが示唆された。一方、IRF8 欠損マウス脊髄サンプルのマイクロアレイ解析から、IRF8 によって制御を受けると予想される分子をリストアップした。その中でミクログリアの細胞貪食に関わる P2Y6R は、神経損傷後の脊髄で持続的に発現増加することを明らかにした。また、ATP に対するミクログリアの遊走性も IRF8 の欠損で低下した。さらに興味深いことに、IRF8 制御遺伝子としていくつかの転写因子が含まれており、IRF8 が他の転写因子の発現を制御して最終的に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も浮上した。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計12件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計8件  <b>Makoto Tsuda</b>, Hidetoshi Tozaki-Saitoh, Kazuhide Inoue: Purinergic system, microglia and neuropathic pain. <i>Current Opinion in Pharmacology</i> 12: 74-79 (2012).                  Kazuhide Inoue, <b>Makoto Tsuda</b>: Purinergic systems, neuropathic pain and the role of microglia. <i>Experimental Neurology</i> 234: 293-301 (2012)  <b>Makoto Tsuda</b>, Hidetoshi Tozaki-Saitoh, Kazuhide Inoue: Platelet-activating factor and pain. <i>Biological and Pharmaceutical Bulletin</i> 34: 1159-1162 (2011).                  Kazuya Kuboyama, <b>Makoto Tsuda</b>, Masato Tsutsui, Yumiko Toyohara, Hidetoshi Tozaki-Saitoh, Hiroaki Shimokawa, Nobuyuki Yanagihara, Kazuhide Inoue: Reduced spinal microglial activation and neuropathic pain after nerve injury in mice lacking all three nitric oxide synthases. <i>Molecular Pain</i> 7, 50 (2011).                  Hidetoshi Tozaki-Saitoh, <b>Makoto Tsuda</b>, Kazuhide Inoue: Role of purinergic receptors in CNS function and neuroprotection. <i>Advances in Pharmacology</i> 61: 495-528 (2011).                  Ayako Kataoka, Yui Koga, Ayumi Uesugi, Hidetoshi Tozaki-Saitoh, <b>Makoto Tsuda</b>, Kazuhide Inoue: Involvement of vasodilator-stimulated phosphoprotein in UDP-induced microglial actin aggregation via PKC- and Rho-dependent pathways. <i>Purinergic Signalling</i> 7, 403-411 (2011).                  Kazuya Kuboyama, Hideki Harada, Hidetoshi Tozaki-Saitoh, <b>Makoto Tsuda</b>, Kazuo Ushijima, Kazuhide Inoue: Astrocytic P2Y1 receptor is involved in the regulation of cytokine/chemokine transcription and cerebral damage in a rat model of cerebral ischemia. <i>Journal of Cerebral Blood Flow &amp; Metabolism</i> 31, 1930-1941 (2011).                  Knut Biber*, <b>Makoto Tsuda</b>*, Hidetoshi Saitoh-Tozaki*, Keiko Tsukamoto, Emika Toyomitsu, Takahiro Masuda, Hendrikus Boddeke, Kazuhide Inoue: Neuronal CCL21 up-regulates microglia P2X4 expression and initiates neuropathic pain development. <i>EMBO Journal</i> 30: 1864-1873 (2011) *Equal contributors</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計1件  <b>津田 誠</b>, 井上和秀: 痛みの分子メカニズムにおける最近の話題. <i>化学と生物</i> 49, 549-554 (2011)</p> <p>(未掲載) 計3件                  Takahiro Masuda*, <b>Makoto Tsuda</b>*#, 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                  Emika Toyomitsu*, <b>Makoto Tsuda</b>*, Tomohiro Yamashita, Hidetoshi Tozaki-Saitoh, Yoshitaka Tanaka, Kazuhide Inoue: CCL2 promotes P2X4 receptor trafficking to the cell surface of microglia. <i>Purinergic Signalling</i> (in press) *Equal contributors                  Ayumi Uesugi, Ayako Kataoka, Hidetoshi Tozaki-Saitoh, Yui Koga, <b>Makoto Tsuda</b>, Bernard Robaye, Jean-Marie Boeynaems, Kazuhide Inoue: Involvement of protein kinase D in uridine diphosphate-induced microglial macropinocytosis and phagocytosis. <i>Glia</i> (in press)</p>
<p>会議発表 計15件</p>	<p>専門家向け 計15件                  &lt;シンポジウム&gt;                  津田誠, 井上和秀 「グリア細胞の役割から慢性疼痛メカニズムを探る」 第85回日本薬理学会年会(京都, 2012.3.14-16), 京都大学 ※シンポジウムオーガナイザー兼務                  津田誠, 井上和秀 「脊髄ミクログリア細胞から探る慢性疼痛メカニズム」 第21回神経行動薬理若手研究者の集い(京都, 2012.3.13), 大阪歯科大学 ※シンポジウムオーガナイザー兼務                  Makoto Tsuda, Takahiro Masuda, Kazuhide Inoue 「IRF8 is a critical transcription factor required for microglia activation」 第34回分子生物学会(横浜, 2011.12.13-16) 東京大学                  津田誠, 増田隆博, 齊藤秀俊, 井上和秀 「神経障害性疼痛に重要なミクログリア転写因子」 第39回薬物活性シンポジウム(福岡, 2011.11.21) 福岡大学                  津田誠, 井上和秀 「神経障害性疼痛とグリア細胞～その役割と分子メカニズム～」 第4回日本運動器疼痛学会(大阪, 2011.11.19-20) 大阪大学                  Makoto Tsuda, Takahiro Masuda, Kazuhide Inoue 「Microglia in pain signaling」 10th Euroglia Meeting on Glial Cells in Health and Diseases (Prague, Czech Republic, Sep 13-17, 2011) Academy of Sciences of the Czech Republic                  津田誠, 井上和秀 「脊髄グリア細胞から探る神経障害性疼痛メカニズム」 第16回日本緩和医療学会学術大会(札幌, 2011.7.29-30) 十和田市立中央病院                  Makoto Tsuda, Kazuhide Inoue 「Spinal microglia: crucial non-neuronal cells for neuropathic pain」 2nd KPRC Seoul Pain Symposium Program (Seoul, Jun 17, 2011) Seoul National</p>

様式19 別紙1

	<p>University 津田誠, 井上和秀 「痛みの慢性化を抑制するグリア細胞制御」 日本麻酔科学会第58回学術集会(神戸, 2011.5.19-21) 慶応義塾大学</p> <p>&lt;一般発表&gt; 増田隆博, 津田誠, 吉永遼平, 西本奈央, 岩本祥祐, 田村智彦, 井上和秀 「神経障害性疼痛時における IRF ファミリー転写因子を基軸としたミクログリア遺伝子の発現制御」 第84回日本薬理学会年会(京都, 2012.3.14-16) 京都大学 吉永遼平, 津田誠, 増田隆博, 西本奈央, 齊藤秀俊, 田村智彦, 井上和秀 「脊髄ミクログリアの interferon regulatory factor-5 は神経障害性疼痛の発現に重要な転写因子である」 第84回日本薬理学会年会(京都, 2012.3.14-16) 京都大学 米田聡介, 齊藤秀俊, 増田潤哉, 津田誠, 井上和秀 「ミクログリア活性化における転写因子 MafB の役割」 第84回日本薬理学会年会(京都, 2012.3.14-16) 京都大学 増田潤哉, 齊藤秀俊, 米田聡介, 津田誠, 井上和秀 「神経障害性疼痛モデルにおいて脊髄ミクログリア特異的に発現する転写因子 MafB の役割」 第64回日本薬理学会西南部会(福岡, 2011.11.20) 第一薬科大学 増田隆博, 津田誠, 吉永遼平, 齊藤秀俊, 田村智彦, 井上和秀 「Interferon regulatory factor-8 は、神経損傷後に見られる脊髄ミクログリアの過活動状態への移行に重要な転写因子である」 第54回日本神経化学学会大会(石川県山代温泉, 2011.9.26-28) 金沢大学 吉永遼平, 津田誠, 増田隆博, 西本奈央, 齊藤秀俊, 田村智彦, 井上和秀 「脊髄ミクログリアの interferon regulatory factor-5 は神経障害性疼痛の発現に重要な転写因子である」 第54回日本神経化学学会大会(石川県山代温泉, 2011.9.26-28) 金沢大学</p> <p>一般向け 計0件</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: <a href="http://www.phar.kyushu-u.ac.jp/">http://www.phar.kyushu-u.ac.jp/</a> 薬理学分野: <a href="http://yakkou.phar.kyushu-u.ac.jp/">http://yakkou.phar.kyushu-u.ac.jp/</a></p>
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<p>平成24年2月28日にアクロス福岡国際会議場で開催された「九州大学 最先端・次世代研究開発支援プログラム研究発表会」にて本研究の概要をポスターパネルで掲示した。</p>
<p>新聞・一般雑誌等掲載 計1件</p>	<p>日本経済新聞(2012. 2. 26, 15面)「ナゾ謎かがく: 激しい痛みはなぜ起きる？」</p>
<p>その他</p>	<p>該当なし</p>

4. その他特記事項

H23年度未掲載論文の「Cell Reports 1: 334-340 (2012)」は平成24年4月5日に電子版で掲載され、プレスリリースを九州大学ホームページおよび薬学研究院ホームページから配信し、新聞およびインターネットでも数多く報道された。本件の詳細はH24年度の報告書に記載する。

## 実施状況報告書(平成23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	0	69,100,000	0
間接経費	36,300,000	15,570,000	0	20,730,000	0
合計	157,300,000	67,470,000	0	89,830,000	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	51,220,126	0	0	51,220,126	51,202,443	17,683	0
間接経費	15,366,038	0	0	15,366,038	15,360,733	5,305	0
合計	66,586,164	0	0	66,586,164	66,563,176	22,988	0

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	46,997,778	共焦点スキャナボックス、フローサイトメーター、 試薬、実験器材、動物等
旅費	1,403,560	研究成果発表旅費等
謝金・人件費等	468,938	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	2,332,167	動物飼育費用、受託解析料、学会参加費等
直接経費計	51,202,443	
間接経費計	15,360,733	
合計	66,563,176	

## 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
ライブセルイメージング顕 微鏡共焦点スキャ ナボックス	横河電機株式会 社製 Cell Voyager	1	18,900,000	18,900,000	平成23/ 6/22	九州大学
フローサイトメー ター	米国ベクトン・ディッキ ンソン社製 BD FACSVerse 2レ ザ-6カラータイプ	1	12,994,800	12,994,800	平成24/ 3/ 6	九州大学
CV1000-SP23用追 加対物レンズ・60× 油浸	CV1000-SP37	1	680,400	680,400	平成23/ 6/29	九州大学