

131. ミクログリアにおける転写因子 Mafb の機能解析

齊藤 秀俊

*九州大学 大学院薬学研究院 医療薬科学部門 薬理学分野

Key words : 神経障害性疼痛, ミクログリア, 転写因子

緒言

脊髄ミクログリアは末梢神経の障害に応じ直ちに活性化型へと変化し、神経障害性疼痛を引き起こす。しかしながら、脊髄ミクログリアの活性化メカニズムについてはいまだ未解明な部分が多く、神経障害性疼痛の治療薬開発のために新たな知見が求められている。後肢へ投射する L4 脊髄神経を細胞体末梢側で切断することで作出される神経障害性疼痛モデルマウスの解析から、転写因子の中から Mafb と脊髄ミクログリアの活性化との相関が見られた。そこで本研究では神経障害性疼痛モデルマウスを用い脊髄組織中の Mafb の発現変化や機能について、特に脊髄ミクログリアに着目して解析し、その病態メカニズムへの寄与を確認したので報告する。

方法および結果

1. 神経障害性疼痛モデル動物の脊髄内で MafB の mRNA 発現が増加する

C57BL6/J マウスを用い、L4 腰髄神経を切断することで神経障害性疼痛モデルを作製した。傷害した一次求心性神経の投射先である L4 脊髄後角の組織を採取し、リアルタイム PCR 法を用いて mRNA の発現解析を行ったところ、末梢神経損傷側のみで Mafb の mRNA 発現が術後 2 日目から増加していることを見出した (図 1A)。さらに、同様のサンプルで免疫組織学的解析を行ったところ、神経障害性疼痛モデルマウスの脊髄組織中では、末梢神経損傷側の脊髄後角で Mafb 陽性細胞数の増加が観察された (図 1B、C)。

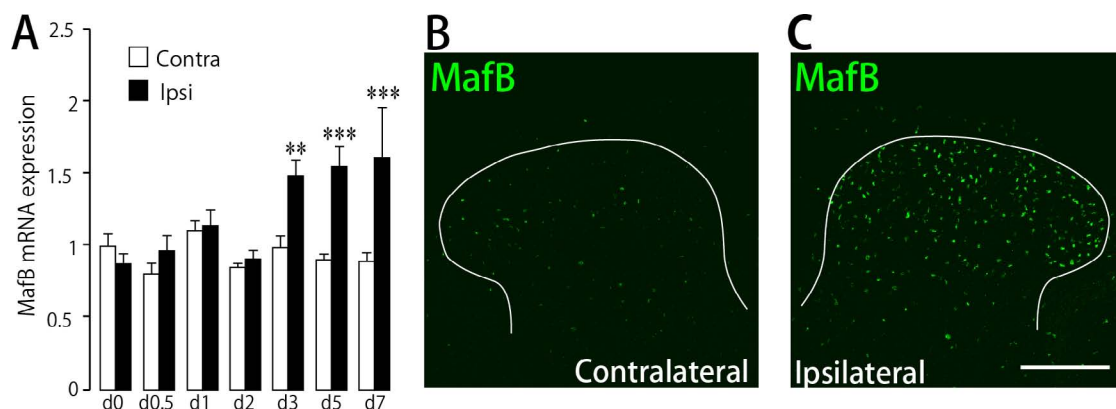


図 1. 神経障害性疼痛病態モデル動物の脊髄組織における Mafb 発現解析結果

(A) リアルタイム PCR 法を用いた Mafb mRNA の発現タイムコース (n=5 each bar graph, **p < 0.01; ***p < 0.001 vs. contra, Bonferroni multiple comparison)。 (B) 脊髄後角の免疫染色像。抗 Mafb 抗体 (緑) による染色において、陽性細胞が、傷害された末梢神経と同側の脊髄後角 (ipsilateral) で増加している。Scale bar: 100 μ m。

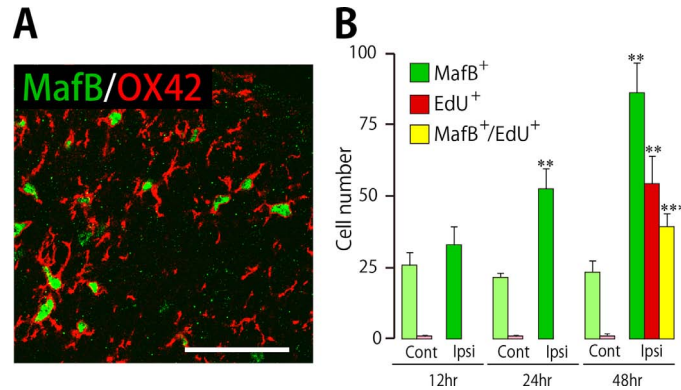


図2. Mafb 発現増加細胞の同定

(A) ミクログリアマーカーと Mafb の共染色画像。突起の染色は見られず、ミクログリア核のみに局在していると考えられる。Scale bar: 50 μ m (B) Mafb 陽性細胞と Edu 陽性細胞の局在解析。Mafb 陽性細胞は術後 24 時間後から増加し、Edu 陽性細胞は 48 時間後に観察された。Edu 陽性細胞の 80 % 以上が Mafb 陽性細胞であった。n = 5 each each time point, **p < 0.01; ***p < 0.001 vs. contra in 12hr, Bonferroni multiple comparison.

2. 神経障害性疼痛モデル動物の脊髄内において MafB 陽性細胞は活性化脊髄ミクログリアである

Mafb タンパクの発現は一部のミクログリアの核内で、脊髄ミクログリアの活性化のタイムコースと相関して増加することを見出した。この Mafb タンパク発現増加細胞は、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、神経細胞それぞれのマーカータンパク質の局在とは一致しなかったことから、ミクログリア特異的な活性化応答と考えられた (図 2A)。神経障害性疼痛モデルマウスの脊髄ではミクログリアの活性化の指標として、細胞増殖と、各種細胞マーカーの発現増加が知られているが、今回、MafB 陽性ミクログリアの局在と細胞増殖マーカーとして Edu 取り込み陽性細胞、又は、活性化マーカーとして CD68 の発現を免疫染色法を用いて検討した。その結果、Edu 陽性細胞の 80 % 以上が Mafb 陽性細胞であったこと、CD68 陽性細胞のほぼすべてが Mafb 陽性細胞であったことを見出した (図 2B)。

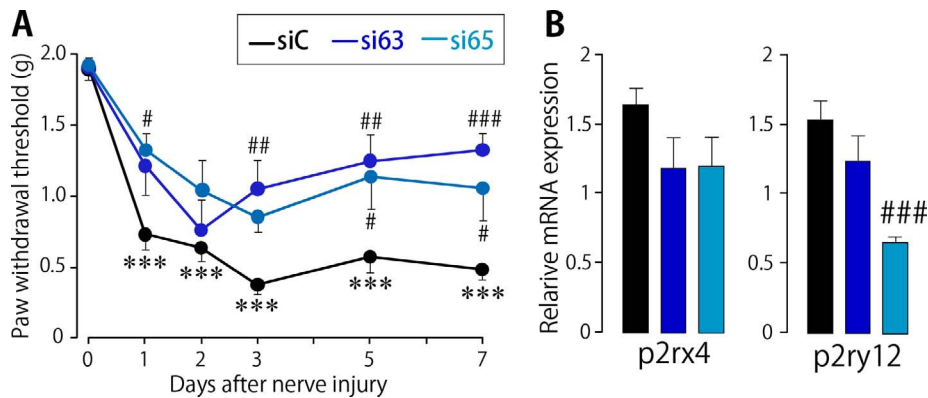


図3. siRNA による Mafb 発現抑制の効果

(A) 神経障害性疼痛モデル動物の脊髄腔内へ配列の異なる 2 種の siRNA (si63, si65, 対照群として siC) を投与し、疼痛病態の発現経過を観察した。両 siRNA とも持続的な痛み閾値の低下を抑制した。(n = 5 each graph, ***p < 0.001 vs. control, #p < 0.05, ##p < 0.01, ###p < 0.001 vs time 0, Bonferroni multiple comparison) (B) siRNA 投与動物における末梢神経傷害後の mRNA 発現変化。Mafb の発現抑制により、ミクログリアの疼痛発現に関わる *p2rx4*, *p2ry12* 遺伝子の発現低下が観察された。n = 5 each each time point, ###p < 0.001 vs. contra in 12hr, Bonferroni multiple comparison.

3. MafB の発現を減弱させると疼痛病態が抑制される

Mafb の発現増加の神経障害性疼痛への関与を証明するために、siRNA を脊髄腔内へ投与し、*maf*b 遺伝子をノックダウンすることを試みた。神経傷害前から siRNA を投与し脊髄組織中の Mafb 発現量を低下させた動物では、末梢神経障害後の痛みが有意に減弱していた (図 3A)。過去に報告のある痛み関連遺伝子^{1,2)} の発現レベルも幾つかの遺伝子においてその発現レベルが低下しており、Mafb 発現が疼痛病態の発症に寄与することが確かめられた (図 3B)。

4. ミクログリア特異的 *maf*b 欠損マウスでは疼痛病態が減弱する

*maf*b 遺伝子の欠損は致死的であるため、*maf*b レポーターマウスを導入し、これを *maf*b ヘテロ欠損マウスとして利用し、神経障害性疼痛モデルに供した。siRNA 投与実験と同様に脊髄組織内の Mafb mRNA 発現レベルは 50 % 程度に低下しており、このマウスでは疼痛発現が減弱していた。ここで、使用したマウスの組織を観察したところ、予想外に *maf*b のレポーター遺伝子 (EGFP) の発現が一部の脊髄神経細胞にも認められた。この事実を受け、脊髄ミクログリア特異的な Mafb 発現増加が病態へ寄与していることを、より明確に証明するために *maf*b ホモ欠損の胎児から初代培養ミクログリアを調製し、これを野生型マウスの髄腔内へ投与する実験手法を導入した。ミクログリアの強力な活性化リガンドである ATP³⁾ で前処置された初代培養ミクログリアは髄腔内へ移植すると翌日まで続く痛み閾値の低下を引き起こすが、*maf*b 遺伝子を持たない初代培養ミクログリアではこのような痛み閾値の低下は観察されなかった。

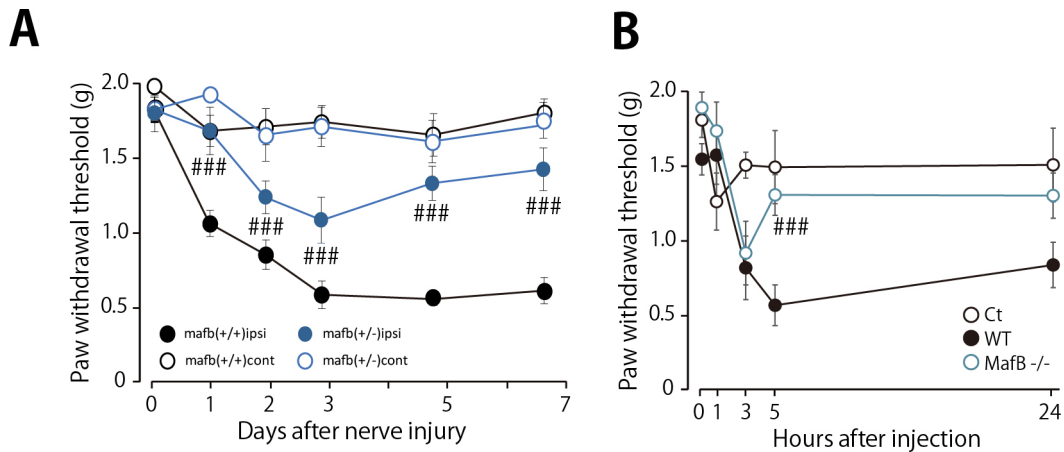


図 4. *maf*b 遺伝子欠損マウスを用いた神経障害性疼痛への関与の検討

(A) *maf*b ヘテロ欠損マウスを用いて神経障害性疼痛モデルマウスを作製した。ヘテロ欠損 (*maf*b (+/-)) マウスにおいては野生型 (*maf*b (+/+)) と比べて有意に痛み閾値の低下が減弱していた。(n = 5 each graph, ###p < 0.05 vs contralateral side. Bonferroni's multiple comparison) (B) 野生型マウス、*maf*b 欠損 (*maf*b -/-) マウスの胎児から得られた初代培養ミクログリアを用いて、ミクログリア髄腔内移植実験を行った。野生型初代培養ミクログリアを ATP 刺激し、髄腔内に移植した動物では 24 時間も見られる痛み閾値の低下が観察される (WT) が、*maf*b 欠損初代培養ミクログリアでは痛み閾値の低下は起こらない。n = 5 each graph, ###p < 0.05 vs WT. Bonferroni's multiple comparison.

考 察

Mafb は広範囲な臓器に関連して、その発達・形成ステップの中で重要な役割を持っている転写因子である。血球系においてはマクロファージに強く発現し、単球からマクロファージへの分化にも影響を及ぼしていることが報告されている。今回ミクログリアにおける Mafb 発現の変化と神経障害性疼痛病態への機能的関与についての検討を世界に先駆けて行った。Mafb の発現制御についてはまだ詳細に検討する余地が多く残されているが、mRNA と免疫染色法によるタンパク質の発現タイムコースに 1 日のズレが観察されており、mRNA の発現増加よりも、タンパク質の発現増加が早く起こっていることが示唆されている。つまりタンパク質の翻訳後の段階でその発現レベルが調節されることが予想され、新たなミクログリア活性化メカニズムの発見にも繋がる可能性がある。Mafb の発現はレポーターマウス

の観察結果を見る限り、成熟個体においても神経細胞等に発現しその機能に関与していると考えられるが、ミクログリアの投与実験から、ミクログリアの Mafb 発現が痛み発現に寄与することが示唆された。今後、ミクログリアの活性化過程における Mafb の発現メカニズムに関与する因子に加えて、Mafb によって制御されている下流の遺伝子群についても、神経障害性疼痛の治療薬ターゲットの探索標的になると考えられる。

共同研究者

本研究の共同研究者は、九州大学薬学研究院薬理学分野の井上和秀、ライフイノベーション分野の津田誠である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝致します。

文 献

- 1) Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Mizokoshi A, Kohsaka S, Salter MW, Inoue K. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature*. 2003;424(6950):778-83. PubMed PMID: 12917686
- 2) 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*. 2008;28(19):4949-56. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0323-08.2008. PMID: 18463248
- 3) 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*. 2009;108(1):115-25. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05744.x. Epub 2008 Nov 10. PMID: 19014371