

令和元年6月4日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10792

研究課題名(和文) 疼痛・情動行動における脳脊髄FFAR1システムの重要性を検証する

研究課題名(英文) Verification of the importance of central FFAR1 system in nociceptive and emotional behaviors in mice

研究代表者

大吉 達樹 (OYOSHI, Tatsuki)

鹿児島大学・医歯学域附属病院・講師

研究者番号：80315407

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：FFAR1(free fatty acid receptor 1)は、遊離中/長鎖脂肪酸を内因性リガンドとするGタンパク質共役型受容体であり、中枢神経系に広く発現しているが、その機能に関しては今なお不明な点が多い。最近我々は、視床下部、青斑核、縫線核等に存在するFFAR1が、オピオイド-モノアミン系を賦活することで抗侵害作用を示すことを見出した。本研究では線条体モノアミン遊離増加が関与するコカイン誘発運動亢進モデルを用い、FFAR1の機能的役割について検討した結果、FFAR1は脳内5-HT遊離を促進することで、コカイン誘発所運動活性を亢進させることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中枢神経系におけるFFAR1の機能に関しては未だ不明な点が多い中、本研究は、コカイン投与による移所運動活性亢進における線条体FFAR1の機能的関与(セロトニン放出促進)を示唆した。本結果は、現在進行している「依存性薬物による行動変化におけるFFAR1の機能的関与」に関する研究を推進するきっかけとなった。また、FFAR1作動薬が脳内セロトニン遊離に関与することから、FFAR1はうつ・不安様行動にも何らかの機能的役割を持つことが推察され、実際、疼痛などのストレス刺激に伴う情動行動変化に重要な役割を持つことが明らかになりつつある。

研究成果の概要(英文)：The free fatty acid receptor 1 (FFAR1) is suggested to function as a G protein-coupled receptor for medium- to long-chain FFAs. Since the role of central FFAR1 has been largely unclarified, we examined the functional role of FFAR1 in the control of striatal monoamines release and cocaine-induced locomotor activity in this study. Acute administration of cocaine enhanced locomotor activity in both FFAR1 wild-type (+/+) and knockout (-/-) mice, but the magnitude of enhancement was significantly reduced in -/- mice. Microdialysis studies revealed that the basal level of dopamine was significantly elevated, while the serotonin (5-HT) level was tended to be reduced in -/- mice. Moreover, local application of a FFAR1 agonist, GW9508, markedly augmented the 5-HT release in +/+ mice, but the enhanced release was lost in -/- mice. These results suggest that FFAR1 has a facilitatory role in striatal 5-HT release, which might potentiate cocaine-induced locomotor activity.

研究分野：脳神経外科学分野

キーワード：FFAR1 GPR40 コカイン 不安様行動 セロトニン in vivo マイクロダイアリシス法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

G protein-coupled receptor 40 / free fatty acid receptor 1 (GPR40/FFAR1: 以下 FFAR1) は、豚ランゲルハンス島細胞に高発現する G タンパク質共役型受容体として発見され、遊離中鎖・長鎖脂肪酸刺激によるグルコース依存性のインスリン分泌促進作用に関わることから、新規 2 型糖尿病治療薬創薬の標的として注目される。一方、FFAR1 は中枢神経系にも広く発現することが発見当初から示唆されていたが、その機能に関しては今なお不明な点が多く残されている。

我々は、基盤研究 (C) (平成 25~27 年度: 新規脂肪酸受容体 GPR40 を介する疼痛抑制メカニズムの研究) の支援を得て、FFAR1 がマウス 1 次感覚神経節および脊髄後角神経細胞に発現していることを見出し、さらに末梢炎症および神経障害に伴ってタンパク質発現レベルの上昇が認められることを見出した。興味深いことに、FFAR1 作動薬は正常マウスには鎮痛作用を示さず、痛覚伝達修飾に重要な脊髄後角第 II 層における興奮性神経伝達に対しても効果は記録する神経細胞によって様々 (促進、抑制、効果なし) であり、全体的には有意な影響を示さなかったが、疼痛モデルマウスにおいては強い鎮痛作用と後角第 II 層におけるシナプス前性の A 線維あるいは C 線維誘起の興奮性神経伝達に対する抑制効果が認められ、また疼痛がより長期間持続する遷延性炎症モデルおよび神経障害モデルにおいては、シナプス後抑制調節の出現も観察された。以上の結果を含め、申請者は、FFAR1 システムは内因性疼痛抑制系を形成する構成要因の一つであり、FFAR1 が鎮痛薬開発の新規ターゲットとして有望であることを最近報告した (Mol. Pain, 11: 6, 2015)。

さらにその後我々の研究グループは、視床下部、青斑核、延髄 (縫線核等) に存在する FFAR1 が、オピオイド-モノアミン系 (下行性疼痛抑制系) を賦活することで抗侵害作用を示すことを見出した。

2. 研究の目的

そこで本研究では、FFAR1 と脳内モノアミン遊離の関係に関して検討する計画を立てた。以前の研究から、FFAR1 は黒質 - 線条体系にも強く発現することが示唆されているため、モノアミン遊離の検討は、線条体において行うこととした。さらに行動学的検討を行うため、モノアミントランスポーター阻害薬であるコカインによる移所運動活性亢進効果に対する FFAR1 の機能的役割について検討を加えた。

3. 研究の方法

本研究は、鹿児島大学動物実験規定、また、国際疼痛学会 (IASP) の実験動物使用規定のガイドラインに従い、鹿児島大学動物実験委員会の承認 (承認番号 MD16077) を得て行った。

(1) 使用動物

本研究では、雄性 GPR40/FFAR1 遺伝子欠損マウス (以下 FFAR1^{-/-}マウス; 8~24 週齢) および雄性 C57BL/6J マウス (以下 FFAR1^{+/+}マウス; 8~21 週齢, Clea Japan, Inc. より購入) を用いた。FFAR1^{-/-}マウス (CARDID: 1882/ C57BL/6-*Ffar1*^{tm1Gdds}: 通常の全身欠損型) は、熊本大学生命資源研究・支援センターより導入した。本欠損マウスの遺伝的背景は C57BL/6J である。マウスは 12 時間明期、12 時間暗期の明暗サイクルで飼育し (明期: 7 a.m.-7 p.m.; 暗期: 7 p.m.-7 a.m.)、すべての実験は明期で行った。

(2) In vivo マイクロダイアリシス

マイクロダイアリシス前日にマウス線条体部へ透析プローブ (AI-(3)-02, エイコム) を設置した。ペントバルビタール (50 mg/kg) 全身麻酔下およびピピバカイン (0.5%) 頭皮皮下投与後にマウスを脳定位固定装置 (室町機械) に固定し、頭頂部の皮膚を切開後、骨膜を綿棒で取り除いた。その後 bregma から側位 1.8 mm にドリルで穴をあけ、上記透析プローブを頭蓋骨下面から深さ 4 mm まで挿入し、歯科用レジンで固定した。マウスは、手術後モノアミン濃度測定まで一晩回復期間を設けた。

ダイアリシス当日、カニューラシーベルが備わった流路にマウスをつなぎ、マウスは実験用ケージの中で自由に動き回れるようにした。リンゲル液 (147 mM NaCl, 4 mM KCl, 2.3 mM CaCl₂) をマイクロシリンジポンプ (ESP-64, エイコム) を用いて流速 2 μ L/min で灌流した。プローブを通過した灌流液は、25 分ごとに回収し、HPLC (HTEC-500, エイコム) を用いて自動モノアミン分析を行った。薬剤 (GW9508: 100 μ M) は、上記と同様の経路で灌流した。

(3) オープンフィールドテスト

マウスをオープンフィールド (50 cm \times 50 cm \times 40 cm の四方形) の中央付近に置き、自発運動量を 5 分間自動計測 (CompACT VAS; Muromachi Kikai, Tokyo, Japan) した。

(4) コカイン誘発移所運動活性評価

移所運動活性 (10 分間隔で 3 分間計測) は、上記オープンフィールドで観察した。コカインは 20 mg/kg を腹腔内 (i.p.) 投与した。

(5) 定量的 PCR によるモノアミントランスポーターおよびドパミン受容体発現の確認

マウスをペントバルビタール麻酔下で断首後、脳を摘出し、線条体部分を採取した。採取した試料から Total RNA を抽出し、その後、High capacity cDNA reverse transcription kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて逆転写反応を行い (製造元推奨条件)、さらに Thunderbird SYBR qPCR Mix (東洋紡) と以下のプライマーペアを用いて定量的 PCR (製造元推奨条件) を行った。

FFAR1 (*Ffar1*): 5' GGG CTT TCC ATT GAA CTT GTT AG 3' (forward), 5' GCC CAG ATG GAG AGT GTA GAC C 3' (reverse)

ドパミントランスポーター (DAT: *s/c6a3*): 5' ACC ACA CCC GCT GCT GAG TAT T 3' (forward), 5' GGT CAT CAA TGC CAC GAC TCT G 3' (reverse)

セロトニントランスポーター (5HTT: *s/c6a4*): 5' AGG AAC GAA GAC GTG TCC GA 3' (forward), 5' CCA AAC CCA GCG TGA TTA ACA T 3' (reverse)

D1 ドパミン受容体 (*Drd1*): 5' CGG CCT TAT CGG TCA TAT TGG 3' (forward), 5' CTG TGG GTA ACG GGT TGG A 3' (reverse)

D2 ドパミン受容体 (*Drd2*): 5' CAG CTC CAA GCG CCG AGT T 3' (forward), 5' GGC AGG GTT GGC AAT GAT ACA C 3' (reverse)

GAPDH: 5' GAA GGT CGG TGT GAA CGG AT 3' (forward), 5' CTC GCT CCT GGA AGA TGG TG 3' (reverse)

(6) 統計処理

データは平均値 ± 標準誤差で示した。多重比較には Dunnett あるいは Turkey 検定、2 群間の比較には Student t 検定を用い、 $P < 0.05$ を有意とした。

4. 研究成果

(1) 線条体における基礎モノアミンおよびモノアミン代謝産物遊離量

図 1 は、正常 FFAR1+/+ および -/- マウス線条体部の基礎モノアミンおよびその代謝物遊離量を示す。ドパミン (DA) 遊離量は、+/+ マウスと比べ -/- マウスにおいて有意に増加していた。一方、セロトニン (5-HT) 遊離量は、減少傾向であった。DA 代謝物である 3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC)、3-メトキシチラミン (3-MT) およびホモバニリン酸 (HVA) 遊離量は、+/+ マウスと比べ -/- マウスにおいて有意に増加していた。一方、5-HT 代謝物である 5-ハイドロキシインドール酢酸 (5-HIAA) 遊離量に関しては+/+と-/-間で差は認められなかった。

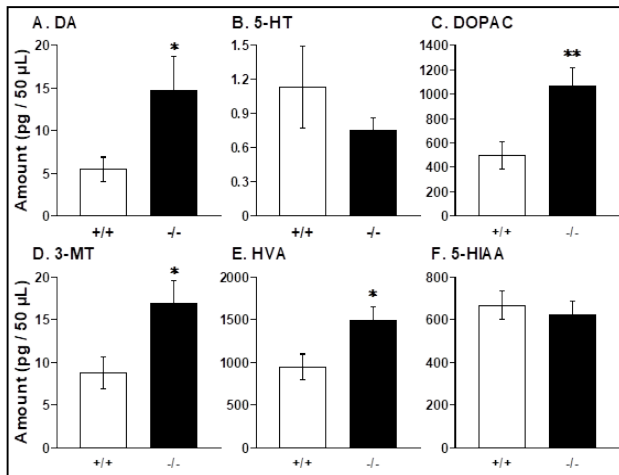


図 1. FFAR1 +/+ および -/- マウス線条体における正常時基礎モノアミンおよびその代謝物の遊離量

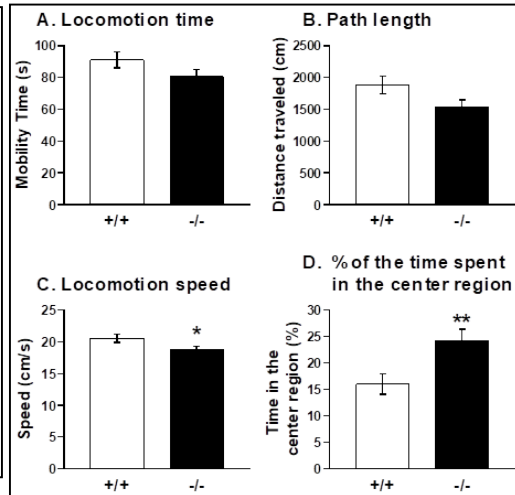


図 2. FFAR1 +/+ および -/- マウスの自発運動量測定

(2) オープンフィールドテスト (5 分間計測)

コカインの移所運動活性効果を検討する前に、正常時における自発運動量を計測するため、5 分間のオープンフィールドテストを行った (図 2)。FFAR1-/- マウスにおいては、自発運動時間、移動距離は+/+ マウスと比較して有意な差はなかったが、中央区画滞在時間は有意に延長していた。また、運動スピードも有意に遅かった。

(3) コカイン誘発移所運動活性亢進効果は FFAR1-/- マウスにおいて有意に減弱している

FFAR1-/- マウスにおいて、線条体モノアミン基礎遊離量の変化が認められたので、モノアミントランスポーター阻害薬コカインの効果に影響が認められるか否かを検討した (図 3)。

コカインを野生型マウスに単回急性投与 (20 mg/kg, i.p.) すると、移所運動活性 (運動時

間、移動距離、移動速度)を急速に亢進させるが、FFAR1^{-/-}マウスにおいては、この効果は有意に減弱していた。また、コカイン投与前(1時間の順応時間中)の3分間運動量測定では、上記5分間運動量測定に比べ有意な中央区画滞在時間延長効果は認められなかったが、コカイン投与後は、有意な中央区画滞在時間延長効果が認められた。

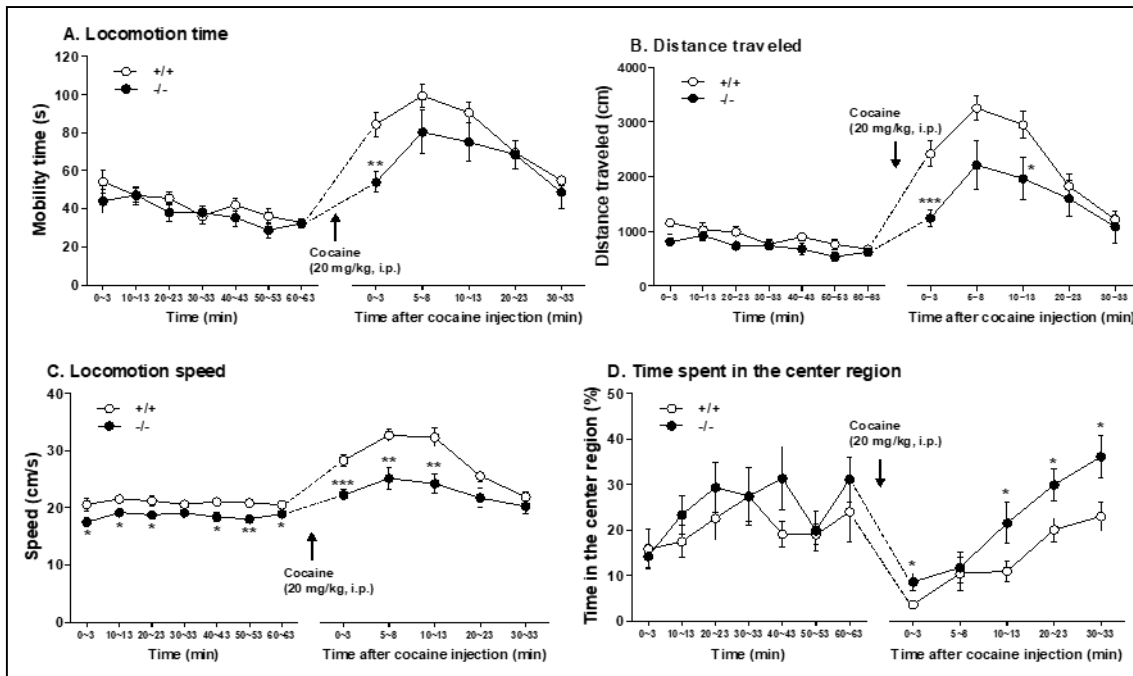


図3. FFAR1^{+/+}および^{-/-}マウスにおけるコカイン誘発移所運動活性の比較

(4) コカイン誘発脳内モノアミン遊離量の比較

FFAR1^{-/-}マウスにおけるコカイン誘発移所運動活性亢進効果の減弱は、コカインによる脳内モノアミン遊離量減弱と関連している可能性を検討するため、*in vivo* microdialysis を線条体に適用した(図4)。コカイン(20 mg/kg, i.p.)を投与すると、DA および 5-HT 遊離量は野生型・欠損マウスともに同程度増加し、有意な変化は認められなかった。しかし、DA 代謝産物遊離量に若干の違いが認められた。すなわち、 $+/+$ マウスにおいて DOPAC と HVA 遊離量は時間とともに減少していくが、 $-/-$ マウスでは増加傾向であった。また、コカイン投与後175分までの総遊離量を合計すると、 $-/-$ マウスの 3-MT と HVA 遊離量は、 $+/+$ マウスに比べ有意に増加していた。

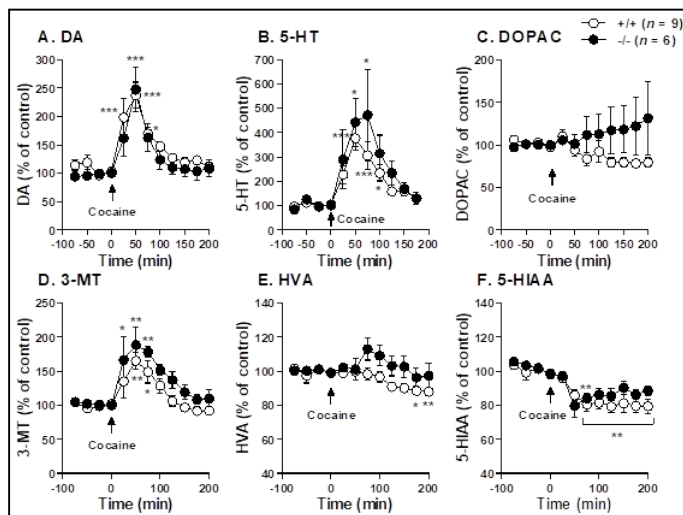


図4. FFAR1^{+/+}および^{-/-}マウスにおけるコカイン誘発線条体モノアミン遊離量の比較

(4) FFAR1 作動薬の脳内モノアミン遊離量に対する効果

図5は、FFAR1 作動薬 GW9508 (100 μ M) を50分間灌流(黒線)させ、脳内モノアミン遊離量の変化を見たものである。 $+/+$ マウスにおいて、GW9508 は 5-HT 遊離量を有意に増加させた。一方、 $-/-$ マウスにおいては、5-HT 遊離量の増加は、認められなかった。DA 遊離量に関しては、GW9508 投与後 $+/+$ および $-/-$ マウスの両方で増加する傾向であったが、 $-/-$ マウスの方は、一旦減少してから増加する傾向であった。

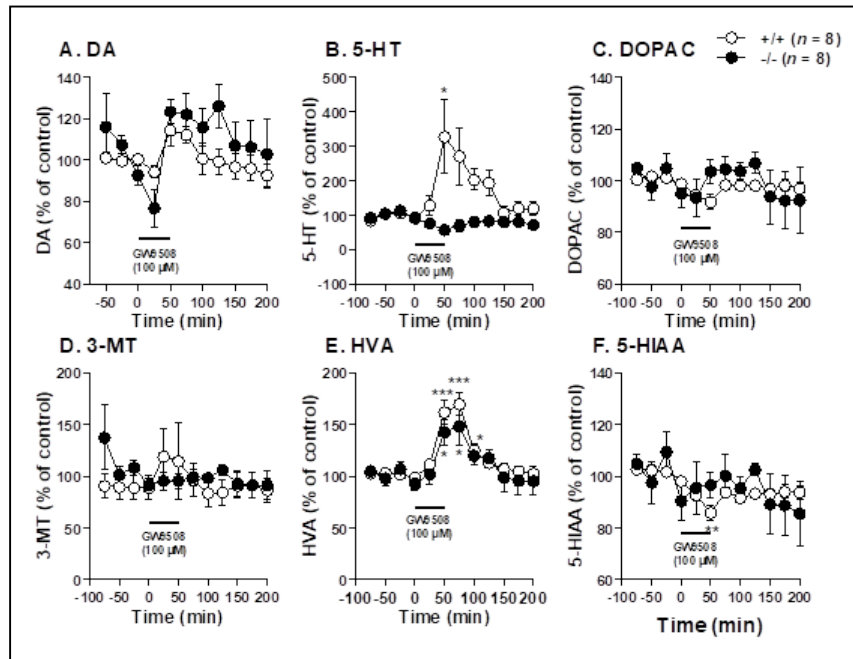


図5. FFAR1 作動薬 (GW9508) による脳内モノアミン遊離量の変化

(5) 線条体におけるモノアミントランスポーターと DA 受容体 mRNA 発現レベルの検討

+/+および-/-マウスの線条体部分から Total RNA を抽出し、モノアミントランスポーターおよび DA 受容体(D1 および D2 受容体)遺伝子の発現レベルを検討するため、定量的 PCR 解析を行ったが、何れに関しても有意な発現レベルの変化は認められなかった (図6)。

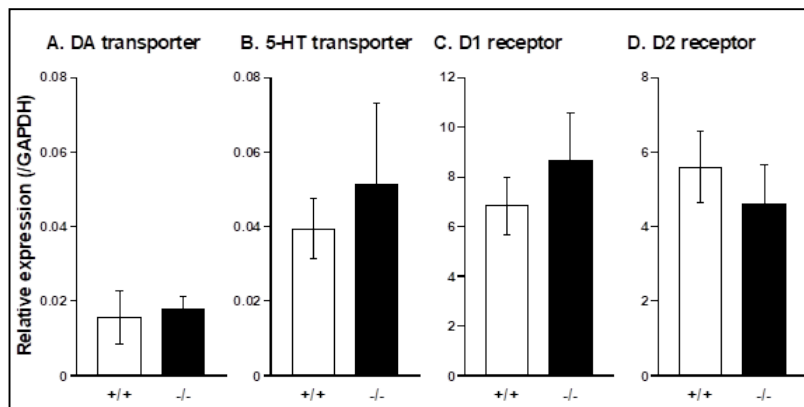


図6 モノアミントランスポーターおよびドパミン受容体の定量的 RT-PCR 解析

以上の結果から、FFAR1^{-/-}マウス (全身欠損型) は野生型マウスに比べ、1) コカイン誘発所運動活性亢進効果が減弱していること、2) 線条体における DA 基礎遊離量の有意な上昇、および 5HT 基礎遊離量の減少傾向が認められること、3) 線条体における FFAR1 作動薬誘発性の 5-HT 遊離能が欠落していることが主な結果として見出された。すなわち、FFAR1 は脳内 5-HT 遊離を促進させることで、コカイン誘発所運動活性亢進効果に関与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

1. Aizawa F, Ogaki Y, Kyoya N, Nishinaka T, Nakamoto K, Kurihara T, Hirasawa A, Miyata A, Tokuyama S. The deletion of GPR40/FFAR1 signaling damages maternal care and emotional function in female mice. *Biol. Pharm. Bull.* 2017;40(8):1255-1259. doi: 10.1248/bpb.b17-00082. PMID: 28769007. 査読有
2. Nakamoto K, Aizawa F, Miyagi K, Yamashita T, Mankura M, Koyama Y, Kasuya F, Hirasawa A, Kurihara T, Miyata A, Tokuyama S. Dysfunctional GPR40/FFAR1 signaling exacerbates pain behavior in mice. *PLoS One* 2017; 12(7):e0180610. doi: 10.1371/journal.pone.0180610. eCollection 2017. PMID: 28723961. 査読有

3. Aizawa F, Nishinaka T, Yamashita T, Nakamoto K, Kurihara T, Hirasawa A, Kasuya F, Miyata A, Tokuyama S. GPR40/FFAR1 deficient mice increase noradrenaline levels in the brain and exhibit abnormal behavior. J. Pharmacol. Sci. 132: 249-254, (2016).
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphs.2016.09.007>. 査読有

〔学会発表〕(計4件)

1. 水沼亮太、栗原 崇、神戸悠輝、平澤 明、中本賀寿夫、大吉達樹、徳山尚吾、有田和徳、宮田篤郎. FFAR1/GPR40 は疼痛遷延化に伴う情動行動変化に關与する. 第 138 回日本薬理学会関東部会、2018 年 3 月 10 日、東京.

2. 貞村祐子、栗原 崇、水沼亮太、神戸悠輝、平澤明、中本賀寿夫、大吉達樹、徳山尚吾、有田和徳、宮田篤郎. GPR40/FFAR1 欠損マウスはコカイン誘発移所運動活性亢進効果が減弱している. 第 70 回日本薬理学会西南部会、2017 年 11 月 18 日、鹿児島.

3. 水沼亮太、栗原 崇、神戸悠輝、平澤明、中本賀寿夫、大吉達樹、徳山尚吾、有田和徳、宮田篤郎. GPR40/FFAR1 は慢性疼痛に伴ううつ病に關与するか? 第 70 回日本薬理学会西南部会、2017 年 11 月 18 日、鹿児島.

4. 貞村祐子、栗原 崇、水沼亮太、神戸悠輝、鮫島芳宗、平澤 明、中本賀寿夫、大吉達樹、徳山尚吾、有田和徳、宮田篤郎. FFAR1 ノックアウトマウスはコカイン誘発移所運動活性が減弱する. 第 90 回日本薬理学会年会 2017 年 3 月 15 日 (Wed.) ~ 17 日 (Fri.)、長崎.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~ns/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：有田 和徳
ローマ字氏名：ARITA Kazunori
所属研究機関名：鹿児島大学
部局名：医歯学総合研究科
職名：客員研究員
研究者番号(8桁)：90212646

研究分担者氏名：宮田 篤郎
ローマ字氏名：MIYATA Atsuro
所属研究機関名：鹿児島大学
部局名：医歯学域医学系
職名：教授
研究者番号(8桁)：60183969

研究分担者氏名：栗原 崇
ローマ字氏名：KURIHARA Takashi
所属研究機関名：鹿児島大学
部局名：医歯学域医学系
職名：准教授
研究者番号(8桁)：60282745

(2) 研究協力者

研究協力者なし。

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。