

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08596

研究課題名(和文)慢性疼痛の治療ターゲットとしての核内受容体REV-ERBの機能解析と創薬への展開

研究課題名(英文) Role of nuclear receptor REV-ERB in chronic pain and their potential as therapeutic targets for analgesics

研究代表者

森岡 徳光 (Morioka, Norimitsu)

広島大学・医系科学研究科(薬)・教授

研究者番号：20346505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では慢性疼痛形成に関与する脊髄グリア細胞の機能制御に対するREV-ERBの役割をin vitro及びin vivo系にて解析することで、REV-ERBの鎮痛薬標的としての可能性を検討した。培養脊髄アストロサイトおよびマイクログリアにおいて、lipopolysaccharide刺激による疼痛誘発物質の産生がREV-ERB作動薬により抑制された。また炎症性疼痛及び神経障害性疼痛モデルにおいて、REV-ERB作動薬を脊髄くも膜下腔内に投与することにより鎮痛効果を示すことが明らかとなった。以上の結果は、脊髄グリア細胞におけるREV-ERBが慢性疼痛の治療標的の一つとなりうる可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経障害性疼痛などの慢性疼痛に対してはモルヒネや非ステロイド性抗炎症薬といった既存の鎮痛薬が奏功しないことが多い。これは慢性疼痛の発症原因と既存薬の作用機序に乖離があるためと考えられる。本研究成果では慢性疼痛の発症原因として深く関与する脊髄グリア細胞の活性化に着目し、それらを鎮静化できる機序として核内受容体REV-ERBを同定した。さらに、REV-ERB作動薬が様々なタイプの慢性疼痛動物モデルにおいて鎮痛効果を発揮することを世界に先駆けて明らかにした。以上のことから、REV-ERB作動薬は既存薬とは異なる作用機序を有した新たな鎮痛薬となる可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The current study elaborated that roles of nuclear receptor REV-ERB in the regulation of glial function in spinal dorsal horn and their potential as therapeutic targets for analgesics. Stimulation of REV-ERB with specific agonists suppressed production of pronociceptive molecules in both cultured spinal astrocytes and cultured spinal microglia. In addition, intrathecal treatment with a REV-ERB agonist ameliorated mechanical hypersensitivity in both inflammatory and neuropathic pain models. Thus, these results demonstrate that REV-ERB in spinal glial cells might be a novel therapeutic target for development of analgesics.

研究分野：神経薬理学

キーワード：REV-ERB 慢性疼痛 アストロサイト ミクログリア 鎮痛薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛、がん性疼痛、糖尿病性疼痛、帯状疱疹後痛は慢性的に病態が形成・維持されるとともに、既存の鎮痛薬が奏功しないため難治性である。これらの慢性疼痛は発症から維持過程において多様な機構が関与しているため、新規鎮痛薬の開発を困難にしている。それ故、慢性疼痛の発症に関わる多くのメカニズムを明らかにするとともに、新たな作用機序を有する鎮痛薬の創製が喫緊の課題である。

ミクログリアやアストロサイトなどのグリア細胞は、シナプス伝達の制御や神経回路網の再構築などに関わっている。これまでに、慢性化した痛みへの伝達には、グリア細胞による炎症性サイトカインの過剰産生や、痛み伝達物質であるグルタミン酸の除去能低下などが深く関与していることが知られている。加えて、脊髄グリア細胞が異常に活性化することによって痛みへの伝達が過剰となり、さらにこれらを改善することで慢性疼痛を緩和できる可能性も示唆されている。それ故、脊髄ミクログリアやアストロサイトの機能異常による痛み伝達の変調を改善するメカニズムを明らかにすることが、有効な鎮痛薬開発への重要なポイントとなる。

脳や脊髄後角などの痛みへの伝達経路における炎症反応は、慢性疼痛を惹起する重要な機構の一つである。慢性疼痛時における脊髄後角では、活性化されたグリア細胞から炎症性サイトカインやケモカインの産生が亢進し、さらにマクロファージや白血球といった炎症性細胞の遊走・浸潤とともにタンパク分解酵素の発現亢進が惹起され、慢性的な炎症反応が生じていることが知られている。一方で、非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)は鎮痛薬として頻用されるが、神経障害性疼痛などの慢性疼痛には著効しない。これらの知見はNSAIDsの作用機序とは異なるメカニズムを介して炎症反応を緩和させる薬物が、新たな鎮痛薬候補となりうる可能性を示唆している。

我々は、慢性疼痛を緩和する新たな創薬ターゲットとして核内受容体である REV-ERB に着目した。REV-ERB は、炎症反応の制御に関わる核内受容体である。特に REV-ERB 作用薬が REV-ERB に結合することで複合体を形成し、これがさらに特定遺伝子のプロモーター領域に結合することで、遺伝子発現を転写レベルで抑制することが知られている。さらに、炎症が病態の基盤となる脂質異常症やアテローム性動脈硬化などのモデル動物において、合成 REV-ERB 作用薬がマクロファージからの炎症性物質産生を抑制することで、病態の改善効果を有していることが報告されている。

以上の知見に基づき、本研究課題では REV-ERB を介した炎症制御機構が慢性疼痛緩和への有望な創薬ターゲットとなる可能性に着目した。

2. 研究の目的

本研究では痛みへの慢性化に深く寄与する脊髄アストロサイトおよびミクログリアの初代培養系を用いて、REV-ERB 作用薬処置による疼痛誘発物質産生に及ぼす影響を検討することで、アストロサイトおよびミクログリア機能制御に対する REV-ERB の役割を明らかにしようとして試みた。また、慢性疼痛モデルマウスを用いて、REV-ERB 作用薬投与による疼痛閾値、ならびに脊髄アストロサイトおよびミクログリア活性化に及ぼす効果を検討することで、鎮痛薬の新たな標的としての REV-ERB の可能性を明らかにしようとして試みた。

3. 研究の方法

Wistar 系ラット新生仔(生後1日)より脊髄を摘出し、酵素処理分散法にて混合グリア細胞を作製した。これらを約1週間培養後、底面のアストロサイト層に弱く付着するミクログリアが出現する。これらを振とうすることでミクログリアを分離調製した。また混合グリア細胞をさらに約3週間培養後、激しく振とうすることでミクログリア等を除去することによりアストロサイトを調製した。疼痛誘発物質の mRNA 発現量は real-time PCR 法、タンパク発現量は ELISA 法にてそれぞれ測定した。マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)-9 の酵素活性は gelatin zymography にて測定した。REV-ERB の knockdown は RNA 干渉法により行った。

雄性 ddy 系マウス(5週齢)を用いて慢性疼痛モデルを作製した。炎症性疼痛モデルとして lipopolysaccharide(LPS)脊髄くも膜下空内投与モデル(LPSモデル)および complete Freund's adjuvant 足底投与モデル(CFAモデル)、神経障害性疼痛モデルとして、坐骨神経部分結紮による partial sciatic nerve ligation(PSNL)モデル、抗がん薬 paclitaxel 全身投与モデル(PTXモデル)、糖尿病性疼痛モデル(streptozotocin 全身投与; STZモデル)をそれぞれ用いた。これらの機械的刺激に対する逃避閾値を von Frey filaments により測定することで疼痛反応を評価した。脊髄後角のアストロサイトおよびミクログリアの活性化は、アストロサイトの活性化マーカーである glial fibrillary acidic protein(GFAP)およびミクログリアの活性化マーカーである ionized calcium-binding adaptor molecule(Iba1)の発現量を免疫組織化学法により測定することで評価した。脊髄後角の疼痛誘発物質の mRNA 発現量は real-time PCR により測定した。

4. 研究成果

1) 培養脊髄アストロサイトにおける疼痛誘発物質産生に対する REV-ERB 作用薬の効果

培養脊髄アストロサイトに LPS を処置すると、疼痛誘発物質(interleukin-1(IL-1)、interleukin-6(IL-6)及びMMP-9)の発現が mRNA 及びタンパク質レベルで増大した。LPS による IL-1 mRNA、IL-6 mRNA 及び MMP-9 mRNA 発現の増大反応は、REV-ERB 作用薬である SR9009 を

前処置することにより濃度依存的に有意に抑制された。SR9009 を単独で処置することによって疼痛誘発物質の発現に対して影響は認められなかった。また SR9009 は tumor necrosis factor (TNF) 処置による IL-1 mRNA、IL-6 mRNA 及び MMP-9 mRNA 発現の増大反応に対しても有意な抑制効果を示した。加えて、LPS による IL-1、IL-6 及び MMP-9 のタンパク質レベルでの増大に対しても SR9009 は有意に抑制した。

疼痛誘発物質の発現増大に対する SR9009 の抑制効果への REV-ERB の関与を明らかにする目的で RNA 干渉法を用いて検討を行ったところ、REV-ERB の knockdown により SR9009 の抑制効果は有意に低下した。

近年、REV-ERB による遺伝子発現抑制作用に histone deacetylase 3 (HDAC3) が関与している可能性が示唆されている。そこで疼痛誘発物質の発現増大に対する SR9009 の抑制効果への HDAC3 の関与を検討した。その結果、HDAC3 選択的阻害薬である RGFP966 を前処置したところ、LPS による IL-1 mRNA 及び IL-6 mRNA 発現増大に対する SR9009 の抑制効果は有意に低下したものの、MMP-9 mRNA 発現増大に対する SR9009 の抑制効果に対しては無影響であった。

2) 培養脊髄ミクログリアにおける疼痛誘発物質産生に対する REV-ERB 作動薬の効果

培養脊髄ミクログリアに LPS を処置すると、疼痛誘発物質 (IL-1、IL-6 及び TNF) の発現が mRNA レベルで増大した。LPS による IL-1 mRNA、IL-6 mRNA 及び TNF mRNA 発現の増大反応は、REV-ERB 作動薬である SR9009 を前処置することにより濃度依存的に有意に抑制された。SR9009 を単独で処置することによって疼痛誘発物質の発現に対して影響は認められなかった。

3) 疼痛モデルマウスの疼痛反応に対する REV-ERB 作動薬の効果

マウス脊髄くも膜下腔内に LPS を投与すると (LPS モデル) 1 時間後より有意な機械的刺激に対する逃避閾値の低下が認められ、この反応は 24 時間持続した。SR9009 を脊髄くも膜下腔内に前処置することにより LPS による機械的刺激に対する逃避閾値の低下は有意に抑制された。LPS モデルにおいて、脊髄後角での IL-1 mRNA 及び IL-6 mRNA 発現の有意な増大が認められたが、MMP-9 mRNA 発現に変化は認められなかった。さらに LPS モデルの脊髄後角における IL-1 mRNA 及び IL-6 mRNA 発現の増大反応は、SR9009 を前処置することにより有意に抑制された。

炎症性疼痛モデルである CFA モデルならびに神経障害性疼痛モデルである PSNL モデル、PTX モデルおよび STZ モデルの機械的刺激に対する逃避閾値の低下に対する SR9009 の効果を検討したところ、いずれの疼痛モデルに対しても SR9009 を脊髄くも膜下腔内に投与することにより有意な抑制効果が認められた。

LPS モデルにおいて、脊髄後角での GFAP 発現および Iba1 発現の増大が認められたが、この反応は SR9009 を前処置することにより有意に抑制された。さらに、PSNL モデルの脊髄後角で認められる GFAP 発現および Iba1 発現の増大も、SR9009 を前処置することにより有意に抑制された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Morioka Norimitsu, Kodama Keitaro, Tomori Mizuki, Yoshikawa Kanade, Saeki Munenori, Nakamura Yuki, Zhang Fang Fang, Hisaoka-Nakashima Kazue, Nakata Yoshihiro	4. 巻 78
2. 論文標題 Stimulation of nuclear receptor REV-ERBs suppresses production of pronociceptive molecules in cultured spinal astrocytes and ameliorates mechanical hypersensitivity of inflammatory and neuropathic pain of mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain, Behavior, and Immunity	6. 最初と最後の頁 116-130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbi.2019.01.014	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 吉川 奏, 児玉景太郎, 中村庸輝, 中島一恵, 仲田義啓, 森岡徳光
2. 発表標題 脊髄アストロサイトにおける核内受容体REV-ERBsを介した炎症性疼痛緩和効果の検討
3. 学会等名 第57回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会・中国四国支部学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 児玉景太郎, 吉川 奏, 武村昌俊, 中村庸輝, 中島一恵, 森岡徳光
2. 発表標題 培養ミクログリアにおける核内受容体REV-ERBsによる炎症制御の機序
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kodama K, Yoshikawa K, Takemura M, Nakamura Y, Nakashima K, Morioka N
2. 発表標題 Effects of nuclear receptor reverb on proinflammatory responses in cultured microglia
3. 学会等名 Society for Neuroscience Annual Meeting, 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 児玉 景太郎, 鶴田 真帆, 武村 昌俊, 岩本 桃香, 中村 庸輝, 中島 一恵, 森岡 徳光
2. 発表標題 ミクログリアにおける核内受容体 REV-ERBs の炎症制御機構の解明
3. 学会等名 第136回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

広島大学大学院医系科学研究科薬効解析科学 https://home.hiroshima-u.ac.jp/pha/

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	中島 一恵 (久岡一恵) (Nakashima Kazue) (20393431)	広島大学・医系科学研究科(薬)・助教 (15401)	
研究分担者	仲田 義啓 (Nakata Yoshihiro) (40133152)	広島大学・医系科学研究科(薬)・名誉教授 (15401)	