

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 9 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11103

研究課題名(和文) CRPS発症と慢性化に関わる局所炎症反応と生理活性脂質の役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of bioactive lipids and local inflammatory responses related to the onset and the chronicity of CRPS

研究代表者

伊藤 伸子 (Ito, Nobuko)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80332609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：CRPSリスクのある術後痛モデルで創傷部生理活性脂質を解析した。アラキドン酸由来脂質と抗炎症作用があるEPA由来脂質が増加した。炎症性と抗炎症性脂質の産生バランスが術後痛に影響することが示唆された。リソホスファチジン酸LPAの急性痛と腰部脊柱管狭窄症(CEC)への影響を産生経路と共に検討した。急性痛反応はLPA受容体拮抗薬投与により抑制され、急性痛にLPAシグナルが関与していることが分かった。CECモデルでは脳脊髄液中で特定のLPA種が対応する前駆体LPC種と共に増加した。LPCは圧迫損傷が誘発された局所領域で検出され、LPCから変換酵素ATXによってLPAが産生されたことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

定量が難しく病態での役割解明が困難であった生理活性脂質について、微量組織から多種脂質分子を同時定量できる測定系を用いて信頼性の高い脂質定量情報が得られた。副作用の多い非ステロイド性鎮痛薬以外の鎮痛薬ターゲットの探索が期待される。

通常では髄液検出がほとんどされないLPAと前駆体LPCが、腰部脊柱管狭窄症モデル髄液で早期より検出された。難治性神経障害性疼痛の治療ターゲットとして髄液におけるLPA産生経路が提示された。これらの結果は神経障害性疼痛患者髄液中のデータと同様であり、このモデルが難治性疼痛発生におけるLPAシグナル伝達の役割を評価するのに適切であることが分かった

研究成果の概要(英文)：Bioactive lipids of wound site were analyzed in a postoperative pain model at risk for CRPS. The arachidonic acid-derived lipids and the EPA-derived lipids having an anti-inflammatory effect were increased. It was suggested that the balance of production of inflammatory and anti-inflammatory lipids affects postoperative pain. The effects of lysophosphatidic acid LPA on acute pain and lumbar spinal canal stenosis (CEC) were investigated together with the production pathway. Acute pain reaction was suppressed by LPA receptor antagonist administration, and it was found that LPA signal was involved in acute pain. In the CEC model, specific LPA species increased with their corresponding precursor LPC species in cerebrospinal fluid. LPC was detected in the local area where compression damage was induced, suggesting that LPA was produced by the converting enzyme ATX from LPC.

研究分野：麻酔科学

キーワード：脂質 疼痛学 神経科学

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

外傷や疾病を契機に局所では炎症細胞浸潤が生じ、炎症性疼痛が生じる。炎症細胞はサイトカインや痛みに関連した代謝産物を蓄積させ更に痛みを増幅させる。痛みは交感神経の興奮を引き起こし、血管収縮を伴う虚血反応、さらには局所組織の低酸素状態によるアシドーシスが引き続いて起こり、慢性炎症と知覚神経の過敏化が長引くことが、遷延性術後痛や複合性局所疼痛症候群(CRPS: Complex Regional Pain Syndrome)の発症機序として知られている。生理活性脂質は初期の炎症細胞浸潤から増加が認められ、炎症増大に主体的に関与していること、またプロスタグランジンが知覚神経の過敏反応に直接作用していることが知られている。しかしこれらの生理活性脂質は分単位で産生増加し消失して行くことから、測定系が安定せず実際の程度どの時期に増加しているのか不明であった。様々な疼痛モデルで疼痛遷延に生理活性脂質がどのように関与しているのか詳細に解析し、時系列や脂質分子シグナルに従った鎮痛薬ターゲットを探索することは、疼痛治療の重要課題である。

### 2. 研究の目的

難治性慢性疼痛である CRPS 進行リスクのある術後痛に対し、様々な生理活性脂質の局所産生量を定量し、炎症反応との相互関係を同時に解析する。さらに生理活性脂質の中でも神経損傷時の脱髄現象に直接関与すると報告されている生理活性脂質リゾホスファチジン酸 LPA の急性痛と高齢者難治性慢性腰痛の原因疾患の一つである腰部脊柱管狭窄症への関与について、産生経路とともに解析する。

### 3. 研究の方法

CRPS モデルとして脛骨骨折後長期ギプス固定による慢性痛モデル作成を試みたが、モデル動物の疼痛行動評価が安定せず、CRPS 進行リスクのある術後痛モデルを用いて創傷部組織中脂質解析を進めた。その後リゾリン脂質 LPA の急性痛への関与、難治性疼痛である腰部脊柱管狭窄症への関与について動物モデルを用いて解析した。

#### (1)術後創傷部脂質解析

生後 10-16 週の雄性成熟 C57BL/6 マウス(n=4-7)を使用し、Pogatzki らの方法に従い術後痛モデルマウスを作成した。イソフルレン麻酔下に右足底皮膚・筋肉に 5mm の縦切開を加えた後、8-0 ナイロン糸にて 2 針縫合した。切開前・切開後 3 時間・1 日後に採取した足底組織を凍結破砕し、メタノールと固相抽出で脂質を抽出し、高速液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析(LC-MS/MS)法により微量脂質(アラキドン酸由来脂質 COX 系および LOX 系脂質、抗炎症脂質 EPA 系脂質類)の定量分析を行った。統計は 1-way ANOVA with Bonferroni を使用し時系列比較、また非切開側の足底組織より抽出された微量脂質と定量比較した。

#### (2)LPA 受容体拮抗薬の急性痛への効果

生後 10-16 週の雄性成熟 C57BL/6 マウス(n=5-7)を使用し透明ケージ内での馴化後、足底に 5%ホルマリン 10  $\mu$ l 注入したのち、注入側肢を振る・舐める疼痛行動時間を 5 分おきに 1 時間計測した。ホルマリン注入前 30 分に LPA 受容体拮抗薬群には LPA 受容体拮抗薬の腹腔内投与を、コントロール群には Vehicle の腹腔内投与を行い比較した。さらに LPA 受容体拮抗薬足底局所投与による鎮痛効果についても解析した。統計は 2-way ANOVA with Bonferroni を使用し両群を比較した。

#### (3)腰部脊柱管狭窄症モデルでのリゾリン脂質量解析

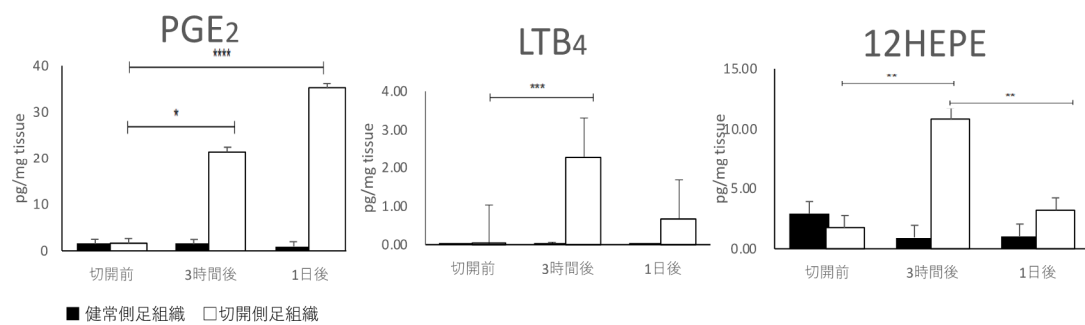
生後 10-16 週の雌性成熟 SD ラット (n=5-7)を使用しイソフルレン麻酔下に腰部切開し脊柱管内にシリコンブロックを挿入し腰部脊柱管狭窄症モデル(馬尾神経圧迫型)を作成した。ロタロッドによる走行試験により、モデル動物で走行時間が低下していた。Naïve, Sham, シリコン挿入 1 日、シリコン挿入 7 日、シリコン挿入 14 日、シリコン挿入 28 日で腰部脊髄組織採取と髄液採

取を行い、高速液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析(LC-MS/MS)法により各 LPA 分子種とその前駆体である LPC 分子種の定量分析を行った。統計は 2-way ANOVA with Bonferroni を使用し時系列で比較した。

#### 4. 研究成果

##### (1)術後創傷部脂質解析

創傷部組織中で微量脂質分子の経時的变化が観察された。切開 3 時間後の極めて早期にアラキドン酸由来の生理活性脂質増加(PGE<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub>)が検出され、炎症や疼痛惹起の要因となっていることが示唆された。抗炎症作用があるとされるエイコサペンタエン酸 (n-6 系脂肪酸) 由来生理活性脂質(12HEPE)も産生増加が認められ、炎症・抗炎症それぞれの脂質シグナルバランスが創傷状態と術後疼痛に影響していることが予想された。(下図)

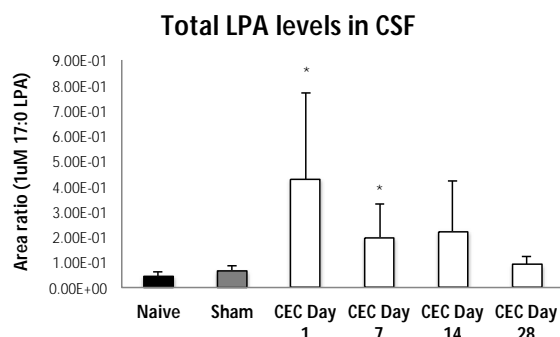


##### (2)LPA 受容体拮抗薬の急性痛への効果

腹腔内ならびに足底投与群ともに、LPA 受容体拮抗薬投与群で Vehicle 群と比較して、ホルマリントテスト第二相で有意な疼痛行動の減弱を認めた。急性痛においても LPA 受容体シグナルの関与が示唆され、今後局所 LPA 産生の解析や、脱髄によらない LPA 受容体を介する疼痛惹起メカニズムについて、今後更に研究を展開して行く予定である。

##### (3)腰部脊柱管狭窄症モデルでのリゾリン脂質定量解析

脊柱管狭窄作成 1 日目より、脳脊髄液中で通常はほとんど検出されない LPA とその前駆体である LPC の有意な増加が認められた。特に LPA16:0, LPA18:2, LPA20:4 の分子種にて増加が認められ、対応する前駆体 LPC 分子種も増加していたことから、髄液中に豊富に存在している変換酵素 Autotaxin により LPA が変換産生されていることが分かった。(下図)



腰部脊髄組織全体での有意な LPA 増加は認められなかったが、脂質イメージングによる詳細な解析により、シリコンブロック近傍の圧迫部位脊髄組織で特異的に LPC が増加していることが認められた。

神経圧迫による LPC の髄液中漏出と LPA 変換を抑制することが、難治性疼痛の標的となることが示唆された

##### 1. 研究開始当初の背景

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 伊藤伸子、浅原美保	4. 巻 25
2. 論文標題 ロイコトリエンによる疼痛伝達機構	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 LiSA	6. 最初と最後の頁 61-68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Uranbileg, B., Ito, N., Kurano, M., Saigusa, D., Saito R., Uruno A., Kano, K., Ikeda, H., Yamada, Y., Sumitani, M., Sekiguchi, M., Aoki, J., Yatomi, Y.	4. 巻 9
2. 論文標題 Alteration of the Lysophosphatidylcholine Levels in Spinal Cord Stenosis: A study Using a Rat Cauda Equina Compression Model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16578
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-52999-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ito N	4. 巻 7
2. 論文標題 Elucidation of local inflammatory response and role of physiologically active lipids-post surgical and neuropathic pain	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Impact	6. 最初と最後の頁 84-85
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21820/23987073.2019.7.84	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 白尾 朋代、浅原 美保、橋本 陽子、伊藤 伸子、横溝 岳彦、山田 芳嗣
2. 発表標題 術後痛創傷部における生理活性脂質の解析
3. 学会等名 日本麻酔科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋本 陽子、伊藤 伸子、浅原 美保、戸津 ときえ、住谷 昌彦、山田 芳嗣
2. 発表標題 急性炎症性疼痛に対するリゾフォスファチジン酸の影響
3. 学会等名 日本麻酔科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hashimoto Y, Ito N, Asahara M, Hasegawa K, Saigusa D, Yamada Y
2. 発表標題 Role of Signaling of Lysophosphatidic Acid in Mice Acute inflammatory Pain Model
3. 学会等名 World Congress on Pain (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋本 陽子、伊藤 伸子、浅原 美保、長谷川 京子、三枝 大輔、山田 芳嗣
2. 発表標題 マウス急性炎症性疼痛モデルに対するリゾフォスファチジン酸シグナルの役割
3. 学会等名 日本疼痛学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅原美保、横島弥栄子、戸津ときえ、伊藤伸子、山田芳嗣
2. 発表標題 マウス術後痛モデルにおけるLTB4-BLT1 シグナリングの役割
3. 学会等名 日本麻酔科学会
4. 発表年 2017年

1 . 発表者名 Yoko Hashimoto, Miho Asahara, Nobuko Ito, Yoshitsugu Yamada, Takehiko Yokomizo, Takao Shimizu
2 . 発表標題 Role of LTB4-BLT1 signaling in mice pain model following hind paw incision
3 . 学会等名 The 15th International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases ( 国際学会 )
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 Uranbileg, B., Hasegawa, K., Ito, N., Kurano, M., Saigusa, D., Kano, K., Ikeda, H., Sumitani, M., Aoki, J., and Yatomi, Y.
2 . 発表標題 The Status of the Sphingolipid Metabolism in Rat Cauda Equina Compression Model.
3 . 学会等名 第58回 日本臨床化学会年次学術集会
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Uranbileg, B., Ito, N., Kurano, M., Saigusa, D., Kano, K., Ikeda, H., Yamada, Y., Sekiguchi, M., Aoki, J., Sumitani, M., and Yatomi, Y.
2 . 発表標題 Involvement of Lysiphsphatidic acid and Autotaxin in neuropathic pain caused by spinal cord stenosis in rat models.
3 . 学会等名 60th International Conference on the Bioscience of Lipid (ICBL) ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Yoko Hoshino, Nobuko Ito, Kyoko Hasegawa, Daisuke Saigusa, Toshiaki Okuno , Takehiko Yokomizo
2 . 発表標題 Lysophosphatidic Acid Mediate Acute Inflammatory Pain in Mice Models
3 . 学会等名 60th International Conference on the Bioscience of Lipid (ICBL) ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoko Hoshino, Nobuko Ito, Daisuke Saigusa, Toshiaki Okuno, Takehiko Yokomizo
2. 発表標題 Lysophosphatidic Acid mediate formalin-induced inflammatory pain in Mice
3. 学会等名 Neuroscience meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 星野陽子、伊藤伸子、長谷川京子、奥野利明、横溝岳彦
2. 発表標題 急性炎症性疼痛の中樞性感作におけるリゾフォスファチジン酸受容体の役割
3. 学会等名 新学術領域研究第5回領域会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤伸子
2. 発表標題 術後痛のサイエンス ロイコトリエン受容体と炎症性疼痛
3. 学会等名 日本ペインクリニック学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	山田 芳嗣  (YAMADA YOSHITSUGU)  (30166748)	東京大学・医学部附属病院・教授    (12601)	