

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09512

研究課題名(和文)遊離脂肪酸受容体FFAR1は慢性疼痛に伴ううつ症状発症に関与するのか？

研究課題名(英文) Does free fatty acid receptor 1 FFAR1 contribute to the development of chronic pain-associated depression ?

研究代表者

大吉 達樹 (OYOSHI, Tatsuki)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：80315407

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000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、近年我々は、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。そこで本研究では、FFAR1は慢性疼痛に伴ううつ様行動に関与するかどうかを検討したところ、炎症性疼痛モデル/末梢神経障害性疼痛モデルマウスにおける疼痛様行動をFFAR1欠損マウスの方が強く示し、またうつ様行動を強く呈することなどがわかり、FFAR1は脳内セロトニン遊離を調節することで、疼痛に伴ううつなどの情動行動に関与す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

慢性痛患者における精神疾患の併病率は、痛みのない一般人と比較して有意に高いことが、様々な疫学調査から示唆されている。しかし、なぜ慢性疼痛が精神状態に負の影響を与えるのか、その詳しいメカニズムは未だ不明である。

そこで我々の研究グループは、疼痛と情動行動に影響を与える分子としてFFAR1に着目し、FFAR1遺伝子欠損マウスでは疼痛症状とうつ様行動が悪化すること、疼痛症状が強く、慢性化しやすい末梢神経障害性疼痛モデルマウスでは、三環系抗うつ薬の薬効が消失していたことなどから、FFAR1は疼痛慢性化と負情動行動発症調節に重要な分子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Previous our studies have demonstrated that the free fatty acid receptor 1 (FFAR1) is found to be expressed on descending monoamine neurons and central application of a FFAR1 agonist evokes an endogenous antinociception. Furthermore, we have recently found that FFAR1 signaling also contributes to emotional-related behaviors. Thus, in this study, we have investigated a possible involvement of FFAR1 in the development of pain-associated depression-like behavior in mice.

We observed that complete Freund's adjuvant (CFA)- and spinal nerve ligation (SNL)-induced mechanical allodynia and depression-like behaviors were more pronounced in FFAR1<sup>-/-</sup> mice than +/- mice. Furthermore, we found that tricyclic antidepressants blocked the CFA-, but not SNL-induced depression-like behavior. Our data support that FFAR1 signaling contributes to the development of depression-like behavior in pain condition, and potentiating FFAR1 system may be a new strategy to manage comorbid pain and depression.

研究分野：脳神経薬理学

キーワード：FFAR1 GPR40 慢性疼痛 うつ様行動不安様行動 三環系抗うつ薬

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

GPR40/FFAR1 (G protein-coupled receptor 40/free fatty acid receptor 1: 以下、FFAR1) は、遊離中・長鎖脂肪酸 (炭素数 12-22 個の飽和・不飽和脂肪酸。ドコサヘキサエン酸 DHA などの n-3 系脂肪酸も含まれる) などを内因性リガンドとし、膵臓の細胞に高発現するものとして発見された GPCR である。中・長鎖脂肪酸は、FFAR1 を活性化することで、膵臓細胞からグルコース刺激性インスリン分泌を増幅させることが報告されている。すなわち、FFAR1 は糖代謝に関して重要な役割を果たしており、新たな糖尿病治療薬候補として様々な作動薬の開発が進められている。

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; 平成 28~30 年度: 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) の支援を得て、マウス視床下部、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、さらにマウス 1 次感覚神経節および脊髄後角神経細胞にも FFAR1 が発現すること、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、抗侵害効果に関与することなども見出し、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報告した。

脳内オピオイド系やモノアミン系が内因性疼痛抑制系やうつ病などの情動行動の制御に関与していることは、古くから知られている。また、FFAR1 のリガンドの一つと考えられる DHA などの n-3 系脂肪酸の摂取は、心血管疾患のリスク低減ばかりでなく、心的外傷後ストレス、うつ病、統合失調症などの精神障害の発症率を低下させることが臨床試験において示唆されている。逆に、n-3 系脂肪酸の摂取不足は、情動機能障害をもたらすことも動物実験から明らかとなりつつある。これに伴い我々の研究グループは、FFAR1 作動薬 (GW9508) をマウス脳室内に連投 (1 日 1 回 5 日間) すると、うつ様行動を有意に抑制することを見いだしている。

痛みの慢性化は、人の精神状態に大きな影響を与えることは良く知られている。慢性痛患者における精神疾患の併病率は、痛みのない一般人と比較して有意に高いことを、米国の疫学調査が示している。すなわち慢性関節炎/関節リウマチの患者群を対象に、精神疾患の有無を調査した結果、痛みのない一般市民群に比べ、患者群では精神疾患の有病率が 2~3 倍も高いことが分かった (不安障害: 1.9 倍; 全般性不安障害: 2.8 倍; うつ: 2.2 倍; PTSD: 3.2 倍など)。しかし、その脳内メカニズムの詳細は未だ不明である。

### 2. 研究の目的

そこで我々は、疼痛と情動行動に影響を与える分子として FFAR1 に着目し、FFAR1 欠損マウスにおける疼痛行動、および疼痛に伴う負情動行動ならびに三環系抗うつ薬の効果を検討した。

### 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、19048) を得て行った。

#### (1) 動物と処置

本研究では、雌雄の FFAR1 (+/-) マウスの交配で生まれる雄性 FFAR1 (+/+) および (-/-) マウス (8~22 週齢) を使用した。

CFA モデルは、イソフルラン麻酔下で完全フロイントアジュバント (CFA, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) を 25  $\mu$ L 右足後肢足底に皮下投与することで作製した。SNL モデルは、ペントバルビタール (50 mg/kg) 麻酔下およびブピバカイン (0.5%) 切開部局所投与下で右第 4、第 5 腰髄脊髄神経を絹糸で強く結紮することにより作製した。

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: 7AM~7PM; 暗期: 7PM~7AM)、すべての実験は明期で行った。

#### (2) von Frey テスト (機械的疼痛閾値測定)

von Frey テストは、マウスをチャンバーに入れ、1 時間以上環境に順応させた後、マウスの後肢足底面に von Frey フィラメント (室町機械) を垂直に当て、湾曲する程度の力で約 3 秒間保持し、その間の逃避反応の有無を観察した。この逃避反応の 50% 閾値を up-down 法により評価した。

#### (3) 尾懸垂試験

マウスの尾を尾懸垂テスト装置 (MTS-001M, 室町機械) の中の金具にビニールテープで固定することで 6 分間逆さに吊り、その間の不動時間を計測した。CFA モデルでは CFA 投与 14 日目の測定後、SNL モデルにおいては術後 28 日目の測定後に三環系抗うつ薬イミプラミン (60 mg/kg) あるいはアミトリプチリン (10 mg/kg) を腹腔内投与し、投与後 1 時間で再び不動時間を測定した。

#### (4) 定量的 PCR によるモノアミン受容体およびトランスポーター遺伝子発現の確認

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、線条体および扁桃体部分を採取した。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) と表 1 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。

(5) ウェスタンブロット法

マウスより抽出した線条体部は 1.5 mL の lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM EDTA, 250 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 0.1 % protease inhibitor cocktail, 0.1 % phosphatase inhibitor cocktail) を加え、4 でホモジナイズした。この溶解液を 15,000g で 10 分間遠心した後、上清を回収しそれぞれのタンパク質含有量を計測した。タンパク質 5~10 µg を 12.5 % SDS-PAGE で分離し、PVDF membrane に転写した。この membrane は 1 % BSA を含む TBS-T buffer (131 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, 0.1 % Tween-20) を用いて室温で 1 時間のブロッキングを行った後、anti-DA (ドパミン) transporter monoclonal antibody (rat, 1:200, Millipore MAB369)、anti-5-HT transporter polyclonal antibody (rabbit, 1:2,000, Alomone Labs AMT-004)、anti-D1 DA receptor monoclonal antibody (rat, 1:100, Sigma-Aldrich D2994)、あるいは anti-D2 DA receptor polyclonal antibody (rabbit, 1:2,000, Millipore AB5084P) を 4 で一晩反応させ、ECL Prime kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom) (1 : 50,000, Amersham) を用いて検出した。また定量的解析のため、anti-actin antibody (mouse monoclonal, 1:2,000; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX) でリブローブして内部標準に用い、ImageJ software, version 1.46 により対応するバンドの画像解析を行った。

(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 Steel 検定、2 群間の比較には Student t 検定あるいは Mann-Whitney U 検定を用い、 $P < 0.05$  を有意とした。

gene	Official Full Name	sequence
Slc6a2	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, noradrenalin), member 2	Upper TTCTTCAAAGGAGTGGGCTATG
		Lower CCAGGAGTGTCCGAGTT
Slc6a3	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, dopamine), member 3	Upper ACCACACCCGCTGCTGAGTATT
		Lower GGTCACTAATGCCACGACTCTG
Slc6a4	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4	Upper AGGAACGAAGCGTGTCCGA
		Lower CCAAACCCAGCGTGATTAACAT
Drd1	dopamine receptor D1	Upper CGGCCTTATCGTCAATTTGG
		Lower CTGTGGTAAACGGGTTGGA
Drd2	dopamine receptor D2	Upper CAGCTCCAAGCGCGAGTT
		Lower GGCAGGTTGGCAATGATACAC
Htr1a	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A	Upper TCAGCAAGGACCCGCGTACA
		Lower GCTCTGAAGATGCCCATAGA
Htr2a	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A	Upper AATCATTTGCGGTGTGACCATATA
		Lower AAAAGTTGTATCGCGGAGCAG
Htr2c	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2C	Upper GCCTCCTGTTGACAGATTCC
		Lower CACGTTCAATGGTATGCCGATA
Htr3a	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3A	Upper AATTGGTACCCGCTGTAGCCT
		Lower TCTTCGGTGATCGCCACA
Htr7	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 7	Upper GCGCTGAGAGAAGCGAGTTTGT
		Lower GGTTCGCTCTGGATCATGTATC

表 1. 定量的 PCR で使用したプライマー配列

4. 研究成果

(1) von Frey テスト (図 1)

FFAR1 +/+マウスと FFAR1 -/-マウスに CFA 投与および SNL 処置を行い、CFA モデルおよび SNL モデルマウスを作製した。両モデルともに、投与前および投与後経時的に von Frey テストを行った。なお処置前では、+/+および-/-マウスにおいて、左右の足で機械的閾値の差は見られず、また+/+マウス - -/-マウス間の差も認められなかった。

CFA 投与後 1 日目以降の投与側において、有意な機械的閾値の低下が見られた (機械的アロディニアの発症) (図 1A)。投与 3 日目以降は、反対側においても有意な機械的閾値の低下が見られたが、+/+マウスにおける閾値の低下は、14 日目以降回復した。+/+マウスに比べ-/-マウスの方が、全体的に閾値の低下は強く出る傾向にあり、投与後 7 日目および 21 日目では投与側において、14 日目および 21 日目では反対側においても有意な差が見られた。

一方、SNL モデルでは、処置後 1 日目から両側に有意な機械的閾値の低下が見られた (図 1B)。SNL モデルにおいても、+/+マウスに比べ-/-マウスの方が全体的に閾値の低下は強く出る傾向にあった (処置後 2 日目では、-/-マウス処置側において有意に閾値は低下していた:  $P = 0.008$ )。

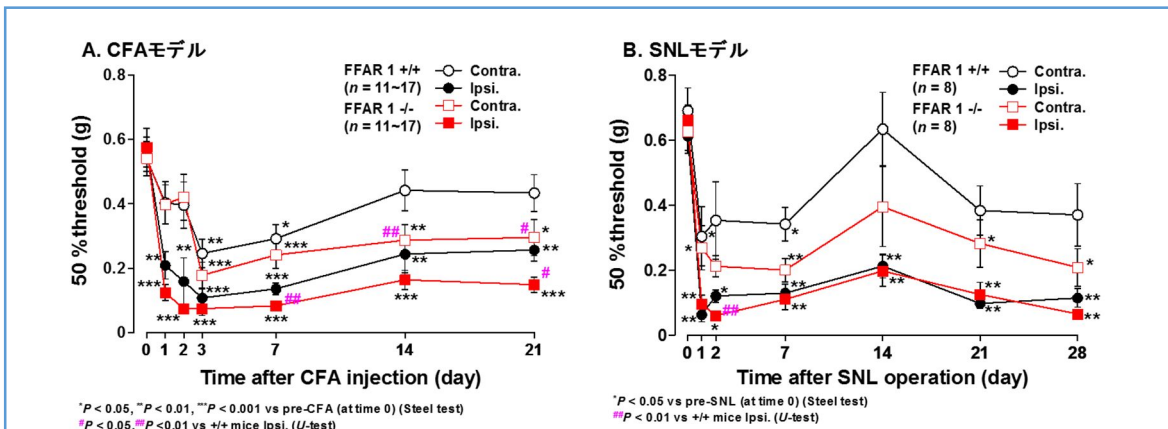


図 1 CFA モデル (A) および SNL モデル (B) における Von Frey テストの結果

処置前では、+/+および-/-マウス間で、左右の後肢、またジェノタイプ間での差も認められなかったが、CFA 投与および SNL 処置により、両側とも-/-マウスにより大きな閾値の低下が見られた。Contra., 反対側; Ipsi. 処置側、同側。

(2) 尾懸垂試験 (図2)

(1)と同様にCFAモデルおよびSNLモデルマウスを作製した。両モデル共に、経時的に尾懸垂試験を行い、CFAモデルでは投与後14日目、SNLモデルでは処置後28日目の試験後にイミプラミン (Imi. 60 mg/kg, i.p.) を投与し、投与1時間後に再び尾懸垂試験を行った。なお、CFA投与およびSNL処置前は、+/+および-/-マウス間で無動時間に差はなかった。

CFAモデル (図2A) では、投与後3日目で+/+および-/-マウスの両方で有意な無動時間延長が認められ、-/-マウスでは、その後無動時間は経時的に延長した。一方、+/+マウスにおいては、3日目以降14日目まで無動時間に変化はなかった。このため、CFA投与後11日目と14日目においては、+/+および-/-マウス間で無動時間の有意な差が見られた。興味深いことに、イミプラミン投与1時間後には、+/+および-/-マウスの無動時間は短縮し、両者間の有意差は認められなくなった。

SNLモデル (図2B) においては、処置後3日目に-/-マウスにおいて有意な無動時間延長が見られ、7日目にはさらに無動時間は延長したが、その後有意な変化はなく、28日目まで無動時間の延長が認められた。一方、+/+マウスでは、処置後11日目、21日目において無動時間の有意な延長が見られたが、28日目においては処置前のレベルまで短縮していた。このため、処置後28日目においては、+/+および-/-マウス間で有意な差が認められた。また、CFAモデルの場合と異なり、イミプラミン投与1時間後においても、+/+と-/-マウス間で依然無動時間の有意差が認められた。

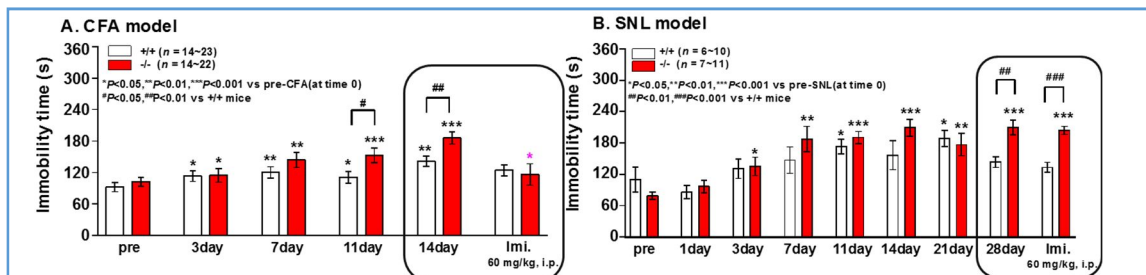


図2 CFAモデル (A) およびSNLモデル (B) における尾懸垂試験の結果  
CFA投与およびSNL処置前にまず尾懸垂試験を行い、その後CFAの右側後肢皮下投与、およびSNL処置を行った。イミプラミン (Imi.) の投与 (腹腔内投与, i.p.) は、CFAモデルでは投与14日目、SNLモデルでは術後28日目の尾懸垂試験直後に行い、投与後1時間で再び尾懸垂試験を行った。  
アミトリプチリンの投与 (10 mg/kg, i.p.) でも同様な結果が得られている。

(3) 定量的PCR (図3~5)

+/+および-/-マウスの線条体および扁桃体部分から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。モノアミントランスポーターに関しては、-/-マウス扁桃体部分において、ノルアドレナリントランスポーター (NAT) の発現レベルが増加傾向であったが、DAおよび5-HTトランスポーターの発現レベルに差は認められなかった (図3)。また、D<sub>1</sub>およびD<sub>2</sub>受容体の発現レベルにも差は認められなかった (図4A, B)。一方、今回検討した5種類の5-HT受容体の中では、5-HT<sub>2C</sub>受容体を除き3種の5-HT受容体 (5-HT<sub>1A</sub>、5-HT<sub>2A</sub>および5-HT<sub>3</sub>受容体) が-/-マウス線条体において発現低下傾向にあり、さらに5-HT<sub>7</sub>受容体は有意に発現減少していた。しかし扁桃体においては、検討した5-HT受容体いずれも発現レベルに違いは認められなかった (図5)。

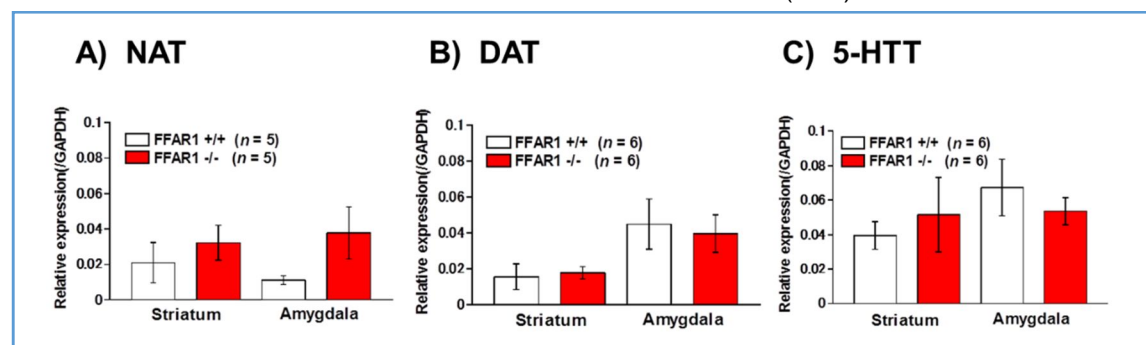


図3 モノアミントランスポーターの定量的RT-PCR解析  
扁桃体部分におけるNAT (ノルアドレナリントランスポーター) 発現量は、-/-マウスにおいて増加傾向であった。一方、線条体および扁桃体両部位において、DAT (ドパミントランスポーター) および5-HTT (5-HTトランスポーター) 発現量に差は認められなかった。

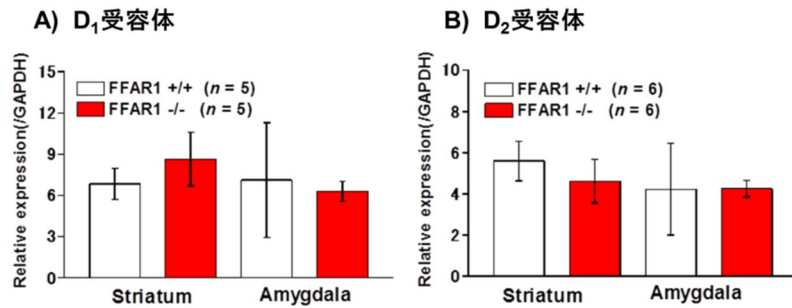


図4 ドパミン受容体の定量的 RT-PCR 解析  
線条体および扁桃体両部位において、D<sub>1</sub>およびD<sub>2</sub>受容体発現量に差は認められなかった。

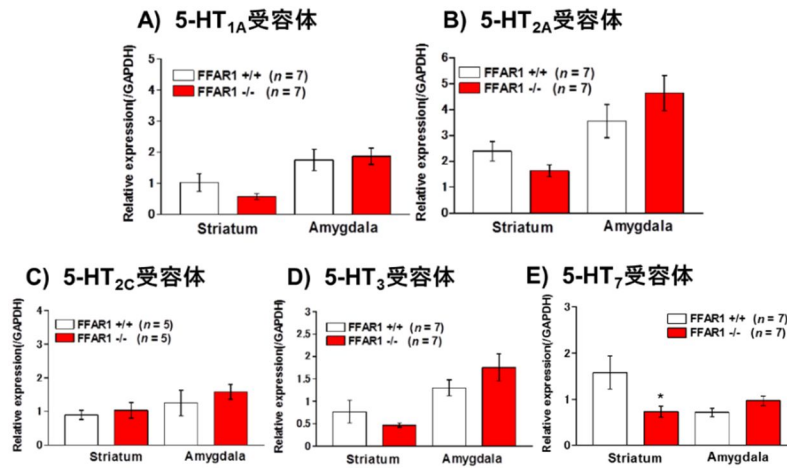


図5 5-HT 受容体の定量的 RT-PCR 解析  
-/-マウス線条体においては、5-HT<sub>1A</sub>、5-HT<sub>2A</sub>および5-HT<sub>3</sub>受容体の発現が減少傾向、5-HT<sub>7</sub>受容体の発現は有意に低下していた ( $P < 0.05$ )。

#### (4) ウェスタンブロット (図6)

+/+および-/-マウスの線条体からタンパク抽出を行い、DAおよび5-HTトランスポーター、D<sub>1</sub>およびD<sub>2</sub>受容体の発現レベルをウェスタンブロット法で検討したが、いずれも発現レベルの違いは認められなかった。

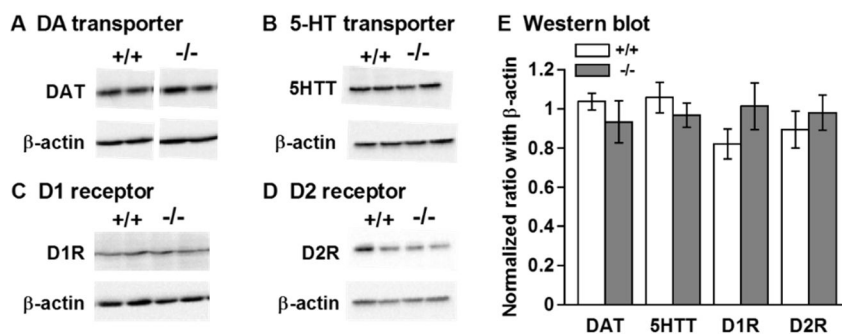


図6 ドパミンおよび5-HTトランスポーター、D1およびD2ドパミン受容体のウェスタンブロット解析  
FFAR1+/+および-/-マウス線条体において、ドパミントランスポーター、5-HTトランスポーター、D1およびD2ドパミン受容体のタンパク質発現レベルの差は認められなかった

以上の結果から、FFAR1-/-マウスは野生型マウスに比べ、CFAおよびSNL処置により誘発される機械的アロディニアをより強く呈すること、それに伴いつ様症状も強く呈することが示唆された。また、疼痛症状がより強く、慢性化しやすい末梢神経障害性疼痛モデルマウスでは、三環系抗うつ薬の薬効が消失していた。これまでの研究結果から、FFAR1は脳内5-HT遊離の調節に係ることが示唆されているが、本研究結果を考慮すると、FFAR1は5-HT遊離を介して疼痛閾値やうつなどの負情動行動を制御する重要な分子の一つである可能性が示唆された。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sadamura Y, Thapa S, Mizunuma R, Kambe Y, Hirasawa A, Nakamoto K, Tokuyama S, Yoshimoto K, Arita K, Miyata A, Oyoshi T and Kurihara T.	4. 巻 12
2. 論文標題 FFAR1/GPR40 contributes to the regulation of striatal monoamine releases and facilitation of cocaine-induced locomotor activity in mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 Article 699026
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2021.699026	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Thapa S, Sadamura Y, Mizunuma R, Kambe Y, Hirasawa A, Nakamoto K, Tokuyama S, Arita K, Yoshimoto K, Miyata A, Oyoshi T and Kurihara T.
2. 発表標題 Involvement of free fatty acid receptor 1 (FFAR1) in the regulation of striatal monoamine releases and cocaine-induced locomotor activity in mice.
3. 学会等名 6th Congress of AsCNP (Asian College of Neuropsychopharmacology) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Thapa S, Sadamura Y, Mizunuma R, Kambe Y, Hirasawa A, Nakamoto K, Tokuyama S, Arita K, Yoshimoto K, Miyata A, Oyoshi T and Kurihara T.
2. 発表標題 Involvement of free fatty acid receptor 1 (FFAR1) in the regulation of striatal monoamine releases and cocaine-induced locomotor activity in mice.
3. 学会等名 第11回トランスポーター研究会九州部会
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	栗原 崇 (KURIHARA Takashi)  (60282745)	鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授  (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------