

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08983

研究課題名(和文) ストレス暴露により生じる慢性疼痛機序における脂肪酸受容体の関与

研究課題名(英文) Involvement of fatty acid receptors in the mechanism of chronic pain induced by stress exposure

研究代表者

中本 賀寿夫 (NAKAMOTO, Kazuo)

神戸学院大学・薬学部・准教授

研究者番号：30432636

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ストレスにより生じる慢性疼痛における長鎖脂肪酸受容体(GPR40/FFAR1)の関与を明らかにするため、腸管上皮細胞選択的にGPR40/FFAR1をノックアウトしたマウスの作製を行った。GPR40-Floxed/Neo(+)マウスとActb-FLPマウスおよびC57BL6Nマウスとの交配を重ね、GPR40-Floxed/Neo(-)、FLP(-)マウスを作製し、さらにこのマウスと腸管上皮細胞にCreリコンビナーゼと変異型エストロゲン受容体(ERT)を発現するVil1-Cre/ERTマウスを交配させ、腸管上皮細胞特異的GPR40/FFAR1欠損マウスの作製に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、腸管上皮細胞特異的にGPR40/FFAR1を欠損させたGPR40CK0マウスの作製に成功した。本マウスは、腸管GPR40/FFAR1の新たな役割の発見やその生理学的意義の解明に貢献できるため、その社会的意義は大きい。さらに、GPR40-Floxedマウスと他のCreドライバーマウスを交配させることで、様々な組織におけるGPR40/FFAR1をノックダウンまたはノックインできる。本研究成果は、新たなGPR40/FFAR1の生理作用の解明につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：To clarify the involvement of long-chain fatty acid receptor (GPR40/FFAR1) in stress-induced chronic pain, we aimed to generate mice with selective GPR40/FFAR1 knockout in intestinal epithelial cells. First, GPR40-Floxed/Neo(+) were mated with Actb-FLP mice to delete neomycin. And then, C57BL6N mice were mated with GPR40-Floxed/Neo(-)FLP(+) mice to generate GPR40-Floxed/Neo(-)FLP(-) mice. GPR40-Floxed/Neo(-)FLP(-) mice were crossed with Vil1 Cre/ERT mice, which express Cre recombinase and mutant estrogen receptor (ERT) in intestinal epithelial cells. Finally, we got intestinal epithelial cell-specific GPR40/FFAR1-deficient mice.

研究分野：中枢薬理学、疼痛学

キーワード：慢性疼痛 ストレス 脂肪酸受容体 GPR40/FFAR1

1. 研究開始当初の背景

1-1 慢性疼痛治療の現状

痛みは、組織損傷が実際に起こった時、あるいは起こりそうな時に付随する不快な感覚および情動体験、あるいはそれに似た不快な感覚および情動体験と定義されており、なかでも慢性疼痛は、急性疾患の通常の経過あるいは創傷の治療に要する妥当な時間を超えて持続する痛みと定義されている。慢性疼痛は最も蔓延している健康問題の一つであり、世界人口の 20%以上が罹患し、経済的にも大きな負担となっている。このため慢性疼痛の緩和に向けた取り組みは、世界的な課題である。

近年、慢性疼痛の形成にはストレス要因が密接に関連するとされている。例えば、慢性疼痛患者の 30-50%にうつ病が合併していると推定されている。心理社会ストレスが強い場合、不安症やうつ病などの精神症状が現れやすく、痛みの経験をネガティブに捉える破局的思考の状態に陥りやすくなる。このように、痛みとストレス病態とは密接に影響しあっているため、心理・社会的ストレス暴露により変動する因子と痛み刺激によって変化する共通因子を同定することが重要である。また既存の鎮痛薬は、対症療法的に痛みを緩和する役割しかないので、痛みの原因となるストレス病態の根本的な治療には至っていない。このような背景から、心理・社会的なストレスによって変調する因子を標的とした慢性疼痛の機序解明に向けた研究や慢性疼痛患者に対する治療効果の向上を目指した創薬研究が不可欠である。

1-2 長鎖脂肪酸受容体 GPR40/FFAR1 の生理作用

長鎖脂肪酸受容体 GPR40/FFAR1 は、今から約 20 年前に発見 (Nature, 2003) されて以降、末梢でのインスリン分泌促進機構に関する研究が進んでいるが、中枢神経系における生理作用の解明に向けた研究は世界的に遅れていた。申請者らのグループを中心として、これまでに疼痛および情動に関する GPR40/FFAR1 の研究を進め、これらの領域においては世界をリードしてきた。例えば、脳内の脂肪酸—GPR40/FFAR1 シグナルはオピオイドペプチドの 1 つである β -エンドルフィンの遊離促進を介した間接的な経路と直接的に内因性の疼痛制御機構を活性化させる経路の両方向のシグナルを介して、痛みを抑制することを報告した (Brain Res., 2012; PLoS One, 2013; Br. J. Pharmacol., 2015)。さらに、疼痛時の脳内の各種脂肪酸は、痛み応答によって、変化することも明らかにした (PLoS One, 2017)。

他方、身体的および精神的ストレスを同時に繰り返し与える社会敗北ストレスモデルマウスへ術後痛を負荷すると、痛みの回復が遅延し、長期に渡って痛みが持続するモデルを作製することに成功した。心理・社会的なストレス因子に伴い惹起される情動機能の異常が、痛みの増悪を引き起こす要因となることが示唆されている。興味深いことに、この痛みの遅延は GPR40/FFAR1 阻害剤投与により悪化した (Psychopharmacology, 2018, Brain Res 2019)。さらに、このマウスの前頭前野および視床下部を含む領域のリン脂質や脂肪酸分布は、ストレス暴露後に著しく低下しており、このマウスへの DHA 長期投与は、情動障害および痛みの悪化を抑制した (Brain Res., 2019)。したがって、ストレス暴露時には、脳内の脂肪酸分布が著しく低下し、脂肪酸シグナルの低下が生じる。この低下によって、内因性の疼痛制御機構を破綻させ、痛みの慢性化を引き起こしているのではないかと仮説をたてた。

臨床および基礎研究では、n-3 系多価不飽和脂肪酸 (n-3 PUFA) の摂取は、ストレスにより生じる精神疾患や慢性疼痛を緩和させるとの報告があることから、脂肪酸を介したシグナル機構の調節がこれら疾患に対して有効である可能性も示されている。以上の点から、本研究では脳内の脂肪酸—GPR40/FFAR1 シグナル機構の制御が、ストレスが引き金となって生じる痛みの慢性化をコントロールできるのではないかとこの着想に至った。

現在、GPR40/FFAR1 の遺伝子改変モデルマウスは、全身性に欠損させたモデルのみである。さらなる GPR40/FFAR1 の生理作用の解明には、GPR40/FFAR1 を各臓器、細胞種特異的または時間依存的に部分欠損させた遺伝子改変モデルマウスが必須となる。

2. 研究の目的

本研究は、GPR40-floxed/Neo (-) /FLP (-) マウスと腸管上皮細胞特異的に Cre リコンビナーゼ、および変異型エストロゲン受容体 (ERT) を発現した ERT Villin1 Cre (transgene) マウスを交配させ、腸管上皮細胞選択的 GPR40/FFAR1 欠損マウスを作製することを試みた。さらに、ストレス誘発慢性疼痛モデルマウスに対する GPR40/FFAR1 アゴニストの効果についても検討を行った。

3. 研究の方法

3-1 動物

C57BL/6J 系統雄性マウス (8 週齢) および ICR 系統雄性マウス (7 週齢) は日本 SLC 株式会社 (静岡、日本) から購入した。C57BL/6J および ICR 系統マウスは、個別にハンドリングを

行った後、温度 24°C、湿度 55±5% の環境下において明暗サイクルが 12 時間 (AM 8:00 点灯、PM 8:00 消灯) の室内にて単独飼育した。なお、固形飼料 (MF、オリエンタル酵母、東京、日本) および水は自由に摂取させた。GPR40-flox 484-C8 F1 Neo/+ 雌雄マウス(8 週齢、新潟大学脳研究所の阿部学先生に作製していただいた)と Actb-FLPe hetero 雄マウス(8 週齢、新潟大学脳研究所より分与) を使用し交配させ、生まれてきた子マウス(6 週齢) を実験で使用した。腸管上皮細胞特異的に発現する B6. Cg-Tg (Vil1-cre/ERT2)23Syr/J マウスは米国 Jaxon ラボラトリーからペアで購入した。全ての実験は、日本薬理学会が策定する動物実験に関する指針に従い、さらに、神戸学院大学動物委員会の承認を得て行った (承認番号: 23-34, 23-35)。

3-2 耳介片抽出液の調製および PCR 用サンプルの調製

子マウスから切り取った耳介片に Digestion Buffer 200 μ L を加え、56°C、16 hr でインキュベートした。その後、200 μ L 用ピペットでピペティングし、1 分静置して 100 μ L を 1.5 mL の新しいチューブにとり、DNAzol (MOR Molecular Research Center Inc.) 1 mL を加え混合した。15 分静置後に、遠心 (4°C、10000g、10 min) を行い、上清 900-950 μ L を 100% EtOH 500 μ L に加えて 8 回転倒混和を行った。3 分静置後、遠心 (4°C、5000g、5 min) を行い、上清をデカンテーションし、75% EtOH 800 μ L を加え、6 回転倒混和した。1 分静置後、更に遠心 (4°C、1000g、2 min) を行い、上清をデカンテーションした。そこへ DNA 溶解液 (0.1 M HEPES 101 μ L, 8 mM NaOH 1 mL) 50 μ L を加え、Pellet を溶解し、dsDNA 量を測定した。

3-3 Polymerase chain reaction (PCR)法

PCR は Mighty Amp (タカラバイオ株式会社)を使用した。ホワイトチューブに 滅菌超純水、2 \times Mighty Amp Buffer、Mighty Amp DNA Polymerase、10 μ M 各種 primer を加えた。PCR 条件は、98°C 1分 を 1 サイクル、98°C 15秒 64°C 2秒 74°C 1分 を 3 サイクル、98°C 15秒 60°C 2秒 74°C 1分 を 5 サイクル、98°C 15秒 56°C 2秒 74°C 1分 を 27サイクル、4°C ∞ で行った。抽出した dsDNA は、PCR サンプル用に DNA 溶解液を用いて 5 ng/ μ L 又は、10 ng/ μ L になるように希釈を行った。プライマーは次のものを使用した。

Neo F; GACGGGGAACAATATGTGTG, Neo R; AGCAGGCTGAGGTGTGTAAG, Flpe: *Primer1: Actb polyA+490bp sense; aatcagccctccacatgg, Primer2: Actb polyA+600bp anti. actaggactcaaccaaccag; Primer3: pCAGGS Pro+90bp anti. ccgtaagtattgaacgcgg, villin1: 19974; GGCCAGGCTGTTCTTCTTAG, oIMR7338; CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT, oIMR7339; GTAGGTGGAAATT, oIMR8346; ATACCGGAGATCATGCAAGC*

3-4 アガロースゲル電気泳動

ゲルは、アガロース (Sigma-Aldrich®) に 1 \times TAE を加え、1.5% アガロースゲルを作製した。電気泳動には、Mupid- α ミニゲル泳動槽(株式会社アドバンス)を用いた。泳動条件として、100V、30 分とし、マーカーとして 200 bp DNA Ladder marker (カラバイオ株式会社 タ)を使用した。PCR サンプルは 10 μ L でアプライし、200 bp DNA Ladder marker は 5 μ L でアプライした。

3-5 エチジウムブロミド染色法

電気泳動を行ったゲルは、0.001% エチジウムブロミド (ナカライテスク株式会社)で 15 分間、遮光状態でインキュベートを行った。その後、超純水で 10 分間遮光状態でインキュベートし洗い込みを行った。

3-6 ゲル撮影条件

染色を行ったゲルは、Mupid-Scope WD (株式会社 タカラバイオ)を用いて、遮光条件下 UV を照射し、撮影した。

3-7 タモキシフェン投与条件

腸管上皮細胞特異的に GPR40 を欠損させるため、ネオマイシン耐性遺伝子、Flippase の除去、かつ ERT Villin1 Cre が Transgene であるマウスに対して、コーン油で 10 mg/mL に調製したタモキシフェン(Sigma-Aldrich®)を 0.1 mL/mouse の用量で 1 日 1 回 5 日間連続投与を行った。生後 4 週目以降、体重変化、餌・水の摂取量について測定した。

3-8 社会的敗北 (SD) ストレスモデルマウス作製

Resident マウスは、ICR マウスを使用し Berton らの報告をもとに作製した。3 週間程度単独飼育を行った ICR マウス (7 週齢) は、性別・週齢が同程度の ICR マウスと同じケージに入れ、アクリル板でケージを 2 つに間仕切り、直接接触ができない条件下 3 日間飼育した。アクリル

板は、透明なものを使用し、複数の小孔を開けることで、音・匂い等の感覚情報が得られるようにした。3 日後アクリル板を除き、各 ICR マウスの攻撃性（攻撃開始 < 2 分）を評価した。3 日間の評価期間終了後、ICR マウスは再度単独飼育した。社会的敗北ストレスには、試験に使用する C57BL/6J マウスとは異なる新規 C57BL/6J マウスに対する攻撃性を、上述と同条件で 3 日間連続評価し、より攻撃性が高い ICR マウスを無作為に抽出した。

Intruder として用いる C57BL/6J マウスは試験 1 週間前から単独飼育を行い、群飼育の影響を排除した。SDS は、身体的ストレスおよび感覚的ストレスを組み合わせ、10 日間連続で行った。スクリーニングを行い無作為に抽出された ICR マウスのケージに C57BL/6J マウスを投入し、10 分間の身体的攻撃に暴露させた（身体的ストレス）。10 分後、身体的ストレスに暴露された同ケージを、小孔の開いた透明なアクリル板で 2 つに間仕切り、音・匂いなどの感覚情報が得られる条件で 24 時間飼育した（感覚的ストレス）。10 日間の SDS は、毎日異なる ICR マウスから暴露されるようにした。

3-9 社会性相互作用試験

社会敗北ストレス暴露によるストレス感受性の評価に用いた。試験に用いる C57BL/6J マウスは試験 1 時間前から試験環境に順化させた。本試験は No Target および Target の 2 つの試験から構成される。オープンフィールドの一端に interaction 領域、その反対側の両端に corner 領域を設け、フィールドが照度 6 ± 2 lux となるように設定した。Interaction 領域に小孔のある箱を置き、オープンフィールドに C57BL/6J マウスを入れ 2.5 分間自由に探索させた（No Target）。C57BL/6J マウスを飼育ケージへ戻した後、interaction 領域に置いた箱の中に、性別・週齢が同程度の ICR マウスを入れた。C57BL/6J マウスをオープンフィールドへ戻し、同様に探索させた（Target）。No Target および Target における総移動距離、interaction 作用領域および corner 領域における滞在時間を測定した。行動はオープンフィールド上部に設けた web カメラで撮影し、その映像を ANY-maze を用いて測定・解析した。各試験終了後にオープンフィールドおよび箱は消毒用アルコールで清拭し、十分に乾燥させた。ストレス感受性は Krishnam らの報告を元に social interaction ratio (SI ratio = time spent in interaction zone during target / time spent in interaction zone during no target) を算出し、1.0 未満をストレス感受性ありとして評価した。

3-10 術後痛モデルマウスの作製

Pogatzlai らの方法を用いて作製した。ddY 系雄性マウスにメドトミジン (0.75 mg/kg)、ミダゾラム (4 mg/kg)、ブトルファノール (5 mg/kg) を含む三種混合麻酔を腹腔内投与し麻酔した。正向反射消失を確認した後、右側後肢底部を 10% ポピドンヨードで消毒し、メスを用いて足裏の皮膚と筋膜をかかとからつま先に向け縦に 1 cm 切開した。次に、メスで縦方向に 5 回筋肉を切開し、先曲ピンセットを用いて断裂しないように筋肉を 10 回持ち上げた。切開後、筋肉を元の位置に戻し、6-0 ナイロンで縫合した後、アミノグリコシド系抗生物質であるゲンタマイシン硫酸塩軟膏 0.1% を手術部位に塗布した。手術には約 6 分要した。手術後、アチパメゾール (0.75 mg/kg) をマウスに投与し、鎮静状態から回復させた。切開を行わない Control 群は、三種混合麻酔を腹腔内投与し麻酔した後、右側後肢底部に 10% ポピドンヨードによる消毒のみ行った。

3-11 von Frey 試験

機械的刺激に対する逃避反応の評価は von Frey 試験を用いた。マウスを金網 (5 × 5 mm) 上に置き 2-3 時間順化させた。後肢の足蹠表面の中心部分に von Frey filament (ブレインサイエンス・イデア株式会社) を当て、機械的な刺激を加えた。filament は 0.4g を使用した。マウスの後肢腹側中心部に、filament を少し曲がるまで垂直に押し当て、6 秒間刺激し逃避反応を観察した。この操作を 10 回繰り返し、逃避反応を示した回数を記録した。フィラメントに対する反応回数の増加を機械的刺激に対する過敏性を痛みとして評価した。

3-12 統計学的処理

一元配置分散解析または二元配置分散解析を行った後に、Tukey test または Bonferroni を用いて統計的解析を行った。2 群間の比較は Student's *t*-test を用いた。全ての結果は、平均 ± 標準誤差として表した。有意差は、危険率 5% を基準とした。

4. 研究成果

4-1 GPR40-Floxed Neo(-)/Flp(-)マウスの同定

PCR 酵素 Mighty Amp を用いて、GPR40-Floxed Neo(-)/Flp(-)マウスのジェノタイピング条件を確立した。PCR 法により標的 DNA を増幅させた結果、ネオマイシン陰性 (Neo-) マウスは、285 bp と 390 bp 付近に 2 本のバンドが認められた。野生型マウスは、285bp 付近に 1 本のバンドが認められ、Neo+ は 350 bp と 2005 bp 付近にバンドが認められた。上記のジェノタイピングにより、ネオマイシンが除去された GPR40-Floxed Neo(-)マウスを同定した。同様に、Flp 除去についても確認した。これらの成果から、GPR40-Floxed Neo(-)/Flp(-)を作製することに成功した。

4-2 GPR40-floxed Neo (-) /Flippase (-) かつ Vil1 Cre (+) マウスに対するタモキシフェン投与の影響

腸管上皮細胞特異的 GPR40 欠損マウスを作製するため、GPR40-floxed Neo (-) /Flp (-) マウスと Vil1 Cre マウスを交配させ、ジェノタイピングにより GPR40-floxed Neo (-) /Flp (-) /Vil1 (+) の産仔を抽出した。エストロゲンアナログであるタモキシフェンを投与した結果、小腸 GPR40 mRNA は vehicle 処置マウスと比べて有意に低下した。しかしながら、本実験条件下では完全に腸管 GPR40 を欠損することはできなかった。完全に抑制できなかったため、タモキシフェンの処置濃度のさらなる検討が必要である。また、GPR40 mRNA は腸管上皮細胞のみならず粘膜固有層などにも発現している可能性があることから、腸管上皮細胞のみで検討する必要がある。

4-3 各種腸管領域における長鎖脂肪酸受容体 (GPR40/FFAR1) の mRNA 発現変化

Control マウスの GPR40/FFAR1 mRNA 発現の変化について、十二指腸サンプルを基準として、空腸、大腸および直腸サンプル間で比較した。空腸の GPR40/FFAR1 mRNA の発現が十二指腸サンプルと比べて約 4 倍多く発現していた。回腸の GPR40/FFAR1 もまた十二指腸サンプルと比べて約 3 倍程度多かった。直腸の GPR40/FFAR1 は十二指腸サンプルと同程度の発現を示した。

4-4 ストレス誘発慢性疼痛モデルマウスに対する GPR40 アゴニストの効果

GPR40 アゴニストのドコサヘキサエン酸 (DHA) の効果を確認するため、社会敗北ストレス負荷期間中、1 日 1 回 25 mmol/kg の用量で 10 日間、経口投与した。その後、マウスへ術後痛を処置したところ、野生型 (WT) マウスへ DHA 処置した群は、術後 1 週間目に機械的刺激に対する反応閾値が有意に増加、すなわち痛み閾値の回復が認められた。一方、GPR40 欠損マウスへ DHA を処置した群は、術後 14 日目まで機械的刺激に対する閾値が低下したままだった。これらの結果は、GPR40 欠損により術後痛による痛みの慢性化が続いていること、DHA は効果が認められなかったことが示唆される。

GPR40 選択的アゴニスト GW9508 (1.0 μg) の脳室内投与は、ストレス誘発慢性疼痛により生じる機械的刺激に対する過敏応答を有意に抑制した。この効果は 45 分後まで持続し、60 分後には消失した。これらの点から、GPR40 アゴニストがストレス誘発慢性疼痛に対して有効である可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Tachibana D, Nakamoto K, Tokuyama S.	4. 巻 42(1)
2. 論文標題 Changes in median eminence of fatty acid-binding protein 3 in a mouse model of pain.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacol Rep.	6. 最初と最後の頁 52-58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/npr2.12225.	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 Nakamoto K, Tokuyama S	4. 巻 24
2. 論文標題 Stress-Induced Changes in the Endogenous Opioid System Cause Dysfunction of Pain and Emotion Regulation.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 11713
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms241411713.	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 -

1. 著者名 Nakamoto K, Tokuyama S.	4. 巻 158
2. 論文標題 The involvement of brain fatty acid-GPR40/FFAR1 signaling in the stress-induced chronic pain.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nihon Yakurigaku Zasshi	6. 最初と最後の頁 449-453
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1254/fpj.23058.	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中本賀寿夫, 徳山尚吾
2. 発表標題 ストレスによる慢性疼痛形成機構における脳内脂肪酸-GPR40/FFAR1シグナルの関与
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 疼痛時の正中隆起における脂肪酸結合蛋白(FABP)の発現変化
2. 発表標題 橘男、中本賀寿夫、徳山尚吾
3. 学会等名 第31回神経行動薬理若手研究者の集い
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Dan Tachibana, Kazuo Nakamoto, Shogo Tokuyama
2. 発表標題 Changes in median eminence of Fatty Acid-Binding Receptor 3 in a Mouse Model of Pain
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中本賀寿夫、徳山尚吾
2. 発表標題 A Long chain Fatty acid receptor signaling as a new therapeutic target for stress-induced chronic pain
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023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	糟谷 史代 (KASUYA Fumiyo) (80131522)	神戸学院大学・薬学部・教授 (34509)	

6. 研究組織（つづき）

	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	徳山 尚吾 (TOKUYAMA Shogo) (70225358)	神戸学院大学・薬学部・教授 (34509)	

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