

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590090

研究課題名（和文） レプチンの疼痛増悪作用における病態生理学的機序の解析

研究課題名（英文） Study on pathophysiological mechanism underlying leptin-induced exacerbation of neuropathic pain

研究代表者

尾崎昌宣（OZAKI MASANOBU）

新潟薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30094650

研究成果の概要（和文）：末梢神経傷害による神経障害性疼痛のモデル動物を用いて、脂肪細胞活性化によるレプチン放出の成因とレプチン刺激による神経炎症応答機構の解明を行った。その結果、レプチンシグナルの上流には、HMGB1 が位置し、脂肪細胞にはたらくことにより、レプチン産生遊離を亢進することを明らかにした。これにより、HMGB1 がレプチンシグナルと連携し、神経障害性疼痛形成の初期メディエーターとして機能することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We studied the mechanism underlying leptin release from adipocytes, which is a mediator for the induction of neuropathic pain underlying of neuropathic pain. The present results indicated that HMGB1, high mobility group box 1 was released from injured peripheral nerve tissue and then, acted on adipocytes to promote leptin release. It was elucidated that HMGB1 was an immediate early mediator for induction of neuropathic pain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
23 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
24 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：疼痛

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛は神経損傷や機能障害を原因とする耐え難い痛みである。麻薬性鎮痛薬などが使用されてきたが、治療抵抗例も存在し、その長期化は QOL 低下に繋がる。その病態生理学的裏付けとして、脊髄ミクログリア細胞の活性化を含む神経炎症反応の関与が慢性疼痛形成の共通基盤として提唱されてきた。しかし、神経障害性疼痛を合併する病態は数多く存在し、疼痛の誘導および維

持機構は多様であり、各病態に応じた予防と治療を図ることが求められている。例えば、糖尿病合併症である末梢神経障害の痛みは、現行の治療概念に基づく薬剤では有効性が限られており、十分な除痛が行われていないのが現状である。

我々は神経障害性疼痛モデル動物を用いて、末梢神経傷害に応じて脂肪細胞から分泌されるレプチンが、傷害部位に集積するマクロファージに作用することにより、疼痛を増

悪することをはじめて明らかにした (図 1)。レプチン動態がダイナミックな変動を示す生活習慣病の合併症である末梢神経障害において、レプチンが疼痛形成分子として働く可能性を提示するものであり、有望な治療標的になりうることを示唆するところに、本研究成果の意義がある。そのため、レプチンシグナル全容の解明は、治療標的の同定と薬剤開発において重要と考えられるが、このような研究は国内外には見当たらない。

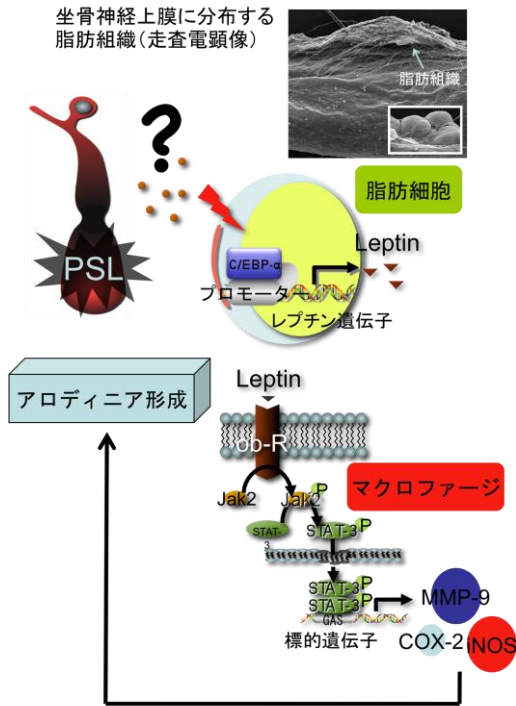


図1. 本研究の背景と仮説

2. 研究の目的

(1) スクレオカインの神経障害性疼痛における機能的関与の検討

スクレオカインは、細胞核に局在するが、刺激を受けて細胞外に分泌、あるいは細胞壊死により放出される炎症性タンパクの総称である。その作用機序として、膜受容体である RAGE あるいは TLR-4 に作用し、炎症性メディエーター産生を亢進すると考えられている。我々は、末梢神経傷害により傷害細胞あるいはマクロファージからスクレオカインが放出され、脂肪細胞に作用してレプチンを産生するという仮説を提唱し、その検証を行った。

(2) レプチン産生を促進するスクレオカインシグナルの解析

我々は傷害坐骨神経において、転写因子 C/EBP α の結合活性の増大によるレプチン遺伝子転写の亢進を明らかにしている。そこ

で、傷害後のスクレオカインによるレプチン産生シグナル機構に、C/EBP α 活性化が介在することを仮説として提唱し、その検証を行った。

3. 研究の方法

(1) スクレオカインの神経障害性疼痛誘導過程への関与の解明

スクレオカインのうち、HMGB1 について検討した。末梢神経傷害による神経障害性疼痛モデルとして、坐骨神経部分結紮を行い、アロディニア (触刺激による疼痛反応) および熱痛覚過敏 (熱刺激による疼痛過敏) を呈するマウスを使用した (PSL マウス)。坐骨神経について、結紮後の HMGB1 タンパクおよび mRNA 発現量の経時変化を調べた。また、免疫組織化学的手法により組織分布と細胞内局在を共焦点顕微鏡にて検索した。HMGB1 遊離量の変化を検討するために、結紮後の坐骨神経を培養液中で維持し、培地中の HMGB1 を ELISA 法により定量した。

(2) HMGB1 によるレプチン産生亢進の機序解明

HMGB1 の細胞内シグナル分子と C/EBP α のクロストークを解明するために、クロマチン免疫沈降 (ChIP) を行い、タンパク相互作用を解析した。標本として、マウス前駆脂肪細胞株である 3T3-L1 細胞を常法に従って分化させた成熟型脂肪細胞を使用した。

(3) 神経障害性疼痛形成における HMGB1 の機能的役割

HMGB1 の疼痛形成への機能的関与を明らかにするために、siRNA および中和抗体を投与して、結紮による疼痛行動への影響を検討した。さらに、HMGB1 が疼痛のイニシエーターであることを調べるために、HMGB1 組換え体を投与して、疼痛行動を評価した。HMGB1 誘発疼痛行動におけるレプチンの関与を明らかにするために、レプチン遺伝子欠損動物である *ob/ob* マウスに対する HMGB1 投与の影響を行動科学的に評価した。

4. 研究成果

(1) PSL によるレプチン遊離機構

マウス坐骨神経部分結紮による末梢神経障害 (PSL) により、傷害側坐骨神経組織のレプチン mRNA 発現量を増加させた。これは、PSL3 時間後から 24 時間後にわたり、sham 処置群と比べて、統計的に有意な増加であった (図 1)。この結果は、坐骨神経阻域におけるレプチン産生が PSL により亢進することを示す。

免疫組織化学的方法により、坐骨神経組織における HMGB1 の発現分布を調べた。Sham 処置の坐骨神経組織については、抗 HMGB1 抗体

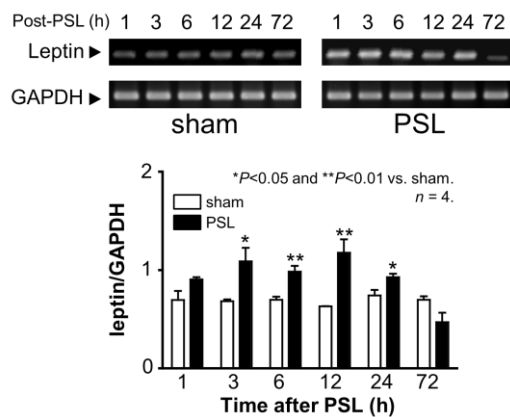


図2. PSLはレプチンmRNAの発現を亢進する sham処置およびPSL処置の坐骨神経組織よりmRNAを抽出し、RT-PCRを行った。

免疫陽性反応はHoechst染色(核染色)部位との共局在を示した。すなわち、HMGB1の分布は核に限られていた。さらに、シュワン細胞のマーカー分子であるS100βに対する抗体の免疫陽性反応を示す細胞に多く分布していた。PSL坐骨神経組織については、HMGB1抗体反応は核以外の部位でも分布がみられた。これらの結果は、坐骨神経組織シュワン細胞の核に分布するHMGB1が、PSLにより核以外の部位に移行する可能性を示唆する。

坐骨神経組織からのHMGB1遊離に及ぼすPSLの影響について検討した。PSL坐骨神経組織をインキュベーションした培養液中のレプチンタンパク量は、sham処置坐骨神経組織をインキュベーションした培養液に比べて、有意に増加していた。同様に、HMGB1タンパク量もPSL坐骨神経組織培養液中で有意に増加していた。いずれもPSL3時間後から24時間にかけて有意な増加がみとめられた。レプチンタンパク量増加におけるHMGB1の関与を明らかにする目的で、HMGB1中和抗体を含む培養液中で、坐骨神経組織をインキュベーションした。中和抗体に対する対照であるIgYを添加した培養液では、PSLにより培養液中のレプチンタンパク量が増加した。一方、中和抗体を添加した培養液中でインキュベーションした坐骨神経組織培養液のレプチンタンパク量は、IgY添加培養液に比べて、有意に低下していた。これらの結果は、坐骨神経組織はPSLにより組織外にレプチンを遊離もしくは漏出するが、その過程にHMGB1が関与することを示唆する。

(2) HMGB1の脂肪細胞に対する作用

脂肪細胞の細胞株である3T3-L1を使用して、HMGB1のレプチン産生および遊離に対する影響を細胞レベルで検討した。3T3-L1細胞の培養液中のレプチンタンパク量をELISA法にて測定した。培養液に組換え体HMGB1を添加すると、レプチンタンパク量は溶媒添加群に比べて、有意に増加した。HMGB1添加後の

3T3-L1細胞からゲノムDNAを回収し、レプチン遺伝子プロモーター領域へのC/EBP-α結合活性をChIP法により調べた。その結果、HMGB1添加3時間後にC/EBPα結合活性の有意な上昇がみとめられた。また、HMGB1の添加は3T3-L1細胞のレプチンmRNA発現量の有意な増加を生じた。以上の結果は、HMGB1が脂肪細胞のレプチンの遊離および産生を亢進することを示唆する。

(3) PSL誘発疼痛形成におけるHMGB1の機能的関与

PSLマウスにおける神経障害性疼痛様行動である触アロディニアおよび熱痛覚過敏の発現におけるHMGB1の機能的関与を調べた。HMGB1遺伝子に対するsiRNAとnegative配列(全遺伝子と相同性がみとめられない対照配列)をPSL前後の4日間にわたり、坐骨神経周囲に投与した。negative配列を投与した群では、PSLによる触アロディニアおよび熱痛覚過敏の発現がみとめられた。これに対し、siRNA投与群のPSLによる触アロディニアおよび熱痛覚過敏の程度は、negative配列に比べて、有意に低下していた。次に、HMGB1中和抗体の神経障害性疼痛様行動に及ぼす影響を検討した。結紮直後および24時間後に、HMGB1中和抗体に対するコントロールであるIgYを坐骨神経周囲に投与したところ、sham処置群に比べて、触アロディニアおよび熱痛覚過敏の発現がみとめられた。HMGB1中和抗体を投与した群では、PSLによる触アロディニアおよび熱痛覚過敏の発現の程度は、IgY投与群に比べて有意に低下していた。これらの結果は、PSL誘発神経障害性疼痛様行動の誘導にHMGB1が関与することを示唆する。

HMGB1が疼痛行動を惹起するかどうかを検討した。組換え体HMGB1を坐骨神経周囲に投与すると、触アロディニアおよび熱痛覚過敏がみとめられた。HMGB1誘発神経障害性疼痛様行動発現におけるレプチンの機能的関与を明らかにする目的で、レプチン遺伝子欠損マウスであるob/obマウスを用いて、HMGB1投与の影響を検討した。野生型マウス(C57B1/6J)では、HMGB1投与により触アロディニアおよび熱痛覚過敏がみとめられた。一方、ob/obマウスでは溶媒投与群とHMGB1投与群の行動発現について、有意な差は認められなかった。これらの結果は、HMGB1誘発神経障害性疼痛様行動の発現に、レプチンが関与することを示唆する。

以上の結果は、神経障害性疼痛行動の発現にはHMGB1が機能的関与を示し、その下流に疼痛増悪因子であるレプチンが位置することを示唆する。

(5) まとめ

本研究成果は、神経障害性疼痛形成におけ

る疼痛増悪因子レプチンの産生遊離を亢進する上流因子を初めて明らかにしたことである。疼痛誘導期の炎症メディエーターの一つとしての可能性を示したことは、今後の慢性疼痛の基礎研究の進展に寄与する成果であると考えられる。さらに、鎮痛薬の新たな標的分子として、創薬領域に基礎的資料の提示につながることを期待される。本研究で用いた神経障害性疼痛モデルは末梢神経損傷に基づくものであるが、レプチンが生活習慣病に深く関与することを考慮すると、糖尿病性末梢神経障害などの生活習慣病に付随する慢性疼痛の誘導にも、本成果である HMGB1-レプチンシグナル系が関与する可能性が考えられる。多様な病因を背景とする慢性疼痛ではあるが、HMGB1-レプチンシグナルが多彩な疼痛の形成に普遍的にはたらいている可能性もあり、臨床現場への貢献を期し、今後のさらなる基礎研究の展開が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

(1) Kobayashi Y, Kiguchi N, Maeda T, Ozaki M, Kishioka S. The critical role of spinal ceramide in the development of partial sciatic nerve ligation-induced neuropathic pain in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有, 2012;421:318-322.

doi: 10.1016/j.bbrc.2012.03.153.

(2) Ueno K, Maeda T, Kiguchi N, Kobayashi Y, Ozaki M, Kishioka S.: Availability of serum corticosterone level for quantitative evaluation of morphine withdrawal in mice. *Drug Discov Ther*. 査読有, 2011;5:71-75.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22466143>

(3) Maeda T, Kiguchi N, Kobayashi Y, Ozaki M, Kishioka S: Increment of activated serine/threonine protein phosphatase in brain membrane fraction synchronized with antinociceptive effect of morphine in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有, 2010;33: 1011-1014.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20522968>

[学会発表] (計 10 件)

(1) 前田武彦, 尾崎昌宣: 慢性および難治性疼痛発症機序の解明と創薬に向けて. 日本薬学会第133年会シンポジウム, 横浜, 2013年3月30日

(2) 前田武彦: 慢性疼痛における脂肪細胞の機能的役割とその制御. 第61回日本薬学会近畿支部

総会シンポジウム, 神戸, 2011年10月22日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾崎 昌宣 (OZAKI MASANOBU)
新潟薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 30094650

(2) 研究分担者

前田 武彦 (MAEDA TAKEHIKO)
新潟薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 50271010

岸岡 史郎 (KISHIOKA SHIROH)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 60137255