

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 24 年 5 月 27 日現在

機関番号：34509
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22791459
 研究課題名（和文）ドコサヘキサエン酸の新規疼痛制御機能の解明と神経障害性疼痛緩和を
 目指した基盤研究
 研究課題名（英文）Basic study on aimed at relief of neuropathic pain, and the elucidation
 of the mechanisms underlying the new pain control system of the docosahexaenoic acid
 研究代表者
 中本 賀寿夫（NAKAMOTO KAZUO）
 神戸学院大学・薬学部・講師
 研究者番号：30432636

研究成果の概要（和文）：

本研究は、ドコサヘキサエン酸（DHA）が各種疼痛評価系において抗侵害作用を示すこと、さらに、その作用機序には脳内の長鎖脂肪酸受容体 GPR40 を介した β エンドルフィンの遊離が関与していることを明らかにした。本研究結果より、脂肪酸が疼痛制御において重要な役割を果たしている可能性と、脳内 GPR40 が疼痛制御機構を担う新たな標的分子となる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

We demonstrated that DHA-induced antinociception via β-endorphin release may be mediated through GPR40 signaling in the supraspinal area, and may provide valuable information on a novel therapeutic approach for pain control.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
平成 23 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、麻酔・蘇生学

キーワード：疼痛管理学

1. 研究開始当初の背景

(1) ドコサヘキサエン酸（DHA）は n-3 系多価不飽和脂肪酸（n-3 PUFA）に分類される生体内物質である。現在、健康食品やサプリメ

ントとしての認知度が高く、安全性も確保されている機能性油脂素材の一つとして注目を集めている。DHA の生理作用としては、抗炎症作用、脳神経保護作用や心血管保護作

用などが知られているが、近年、n-3 PUFA の摂取によって関節リウマチ、月経困難症や筋骨格障害における痛みを軽減することが基礎ならびに臨床研究において報告され、n-3 PUFA の新たな生理作用として疼痛制御における役割が脚光を浴びつつある。しかしながら、n-3 PUFA の主要な一つである DHA が疼痛制御にどのように関与しているかについてはほとんど報告されていない。

(2) 脂肪酸に関する様々な研究報告が蓄積してきた結果、脂肪酸は単なる栄養素に留まらず、シグナル伝達分子として重要な役割を果たしていることがわかってきた。事実、各種脂肪酸がそれぞれ特異的に G 蛋白共役型 7 回膜貫通型の新規膜型脂肪酸受容体 (GPR40, 41, 43, 120 など) を活性化し、種々の生理作用を発揮することが報告されている。なかでも、DHA のような PUFA は GPR40 と GPR120 のリガンドであることが報告され、これらの受容体を介した脂肪酸シグナルは、末梢領域においてインスリンなどのホルモン分泌の調節を介して糖・脂質代謝の恒常性維持に関与していることから、糖尿病治療薬の標的分子として注目されている。興味深いことに、GPR40 や GPR120 を介した作用は、ペプチド、ホルモン、神経伝達物質などを遊離させることが期待されている。これまでの報告によると、DHA はノルアドレナリンやインスリンなどの分泌を促すような作用を有していることから、痛みを制御している内因性オピオイドペプチドなどの遊離にも関与している可能性が考えられる。

一方、中枢神経系領域においては、これら受容体は広範囲にわたって発現していることが知られているにもかかわらず、生理的な意義やその役割はほとんどわかっていない。

2 . 研究の目的

(1) 本研究においては、機能性油脂素材として広く利用されている DHA の、新たな鎮痛薬あるいはその補助薬候補としての有効性について解明することを目的とする。具体的には我々が最近見いだした DHA 自身の有する抗侵害効果機序を解明し、難治性神経障害をも含む、各種疼痛モデル動物に対する有効性を評価する。さらに、難治性疼痛である神経障害性疼痛の形成および維持における内因性 DHA の関与について、行動薬理的、免疫組織化学的に評価を行った。

(2) DHA の β -エンドルフィン遊離を介した抗侵害作用機序の解明を目指す。さらには、最近発見された DHA が作用する G 蛋白共役型 7 回膜貫通型の新規膜型脂肪酸受容体 (GPR40 および GPR120) に着目し、これらの受容体を介した新規疼痛制御機構の可能性について検討を行った。

3 . 研究の方法

(1) 動物

動物は 4-5 週齢の ddY 系雄性マウスを用いた。

(2) 疼痛評価

侵害性熱刺激に対する急性痛の評価には tail flick 法、炎症反応に伴う急性痛および急性持続性疼痛の評価には、それぞれ酢酸ライジン試験およびホルマリン試験を行なった。

(3) 投与方法

DHA (97%) エチルエステル体は 5, 15, 25 mmol/kg の用量で経口投与、あるいは 5, 25 μ g/mouse の用量で脳室内投与下し、対照群にはオリーブ油を投与した。GPR40 および GPR120 の選択的アゴニスト GW9508 は 0.1, 1.0 μ g/mouse の用量で脳室内投与下した。 μ -オピオイド受容体拮抗薬の β -フナルトレキサミン (β -FNA, 20 mg/kg) および κ -オピオイド受容体拮抗薬のノルピナルトルフィミ

ン (nor-BNI, 10 mg/kg) は DHA 投与 24 時間前、 δ -オピオイド受容体拮抗薬のナルトリンドール (NTI, 5 mg/kg) は DHA 投与 30 分前、非選択的オピオイド受容体拮抗薬のナロキソン (1 mg/kg) は DHA 投与 10 分前にそれぞれ腹腔内投与した。抗 β -エンドルフィン抗血清 (希釈率、1:5) は、DHA 投与 1 時間前に脳室内へ投与した。 β -エンドルフィン (0.3 - 1 μ g/マウス) は試験開始 10 分前に脳室内投与した。

(4) 受容体結合実験

DHA の μ - および δ - オピオイド受容体への親和性の検討においては、ラット脳シナプトソーム画分を、 κ -オピオイド受容体にはモルモット小脳シナプトソーム画分を用いた。また、各受容体サブタイプに対する特異的リガンドとして、 μ -オピオイド受容体には [3 H]DAMGO、 δ -受容体には [3 H] デルトルフィン、 κ -オピオイド受容体には [3 H]U-69593 を用い、液体シンチレーションカウンターによって放射活性を測定した。

(5) 血清 β -エンドルフィン量測定

DHA およびオリブオイルを経口投与後、0, 30, 60, 90, 120 分後の血清サンプルを回収し、 β -endorphin EIA (enzyme immunoassay) キットを用いて測定を行った。

(6) 免疫組織染色法

マウス脳切片 (パラフィン切片および凍結切片) を作成し、抗 β -エンドルフィン抗体、および抗 GPR40 抗体を用いて DAB 染色および蛍光免疫組織染色を行った。

(7) ウェスタンブロット法

マウスの各脳部位サンプル (10 μ g/lane) を調製し、抗 GPR40 抗体および抗 GRP120 抗体を用いて、タンパク質発現解析を行った。

(8) 統計解析

結果は平均 \pm 標準誤差として表現した。一元配置分散分析を行った後に、Scheffe multiple comparison test (Scheffe test)、Dunnett test あるいは、Student's *t*-test を用いて統計的解析を行った。有意差は、危険率 5% を基準とした。

4. 研究成果

DHA の経口投与は熱や化学刺激などの種々の疼痛試験において、用量依存的な抗侵害作用を示すこと (図 1 a, b, c) また、各種オピオイド受容体拮抗薬を用いた検討から、DHA の抗侵害作用には μ および δ オピオイド受容体が関与していることを明らかにした (図 2a,) DHA の各種オピオイド受容体に対する結合実験では、何れの受容体にも親和性を示さなかった (図 2b) が、この効果は脳室内へ抗 β -エンドルフィン抗血清を前処置することにより拮抗された。

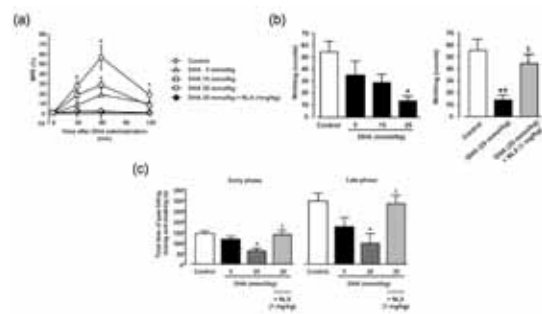


図 1 種々の疼痛評価系を用いた DHA の抗侵害作用

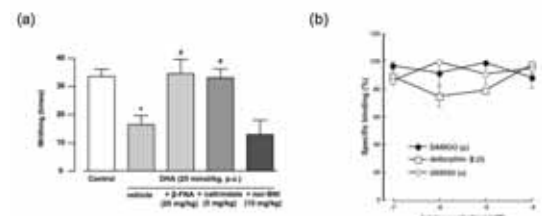


図 2 DHA の抗侵害作用機序における各種オピオイド受容体拮抗薬の関与 (a) ならびに DHA の各種オピオイド受容体結合実験 (b)

したがって、DHA の抗侵害作用発現機序の

一因として、オピオイド受容体に対する直接的な作用ではなく、内因性のオピオイドペプチドの一つである β -エンドルフィンの遊離を介した間接的作用であることを見いだした。DHA の脳室内投与においても抗侵害作用が認められ、そのマウス視床下部弓状核において β -エンドルフィンの発現増加が免疫組織染色法により確認できた。本結果から、DHA は用量依存的に抗侵害作用を示すことから、疼痛制御において重要な役割を果たしている可能性があることが示された。

さらに、DHA の抗侵害作用機序を解明するために、中枢神経系における長鎖脂肪酸受容体 GPR40 に着目した。Western blot 法を用いて検討を行なったところ、大脳皮質、中脳、延髄、視床下部、海馬、嗅球、線条体そして小脳と幅広くタンパク質発現を確認することができた。特に、視床下部、中脳および延髄においては、他の部位と比べて多く発現していることを見出した(図 3a, b)。

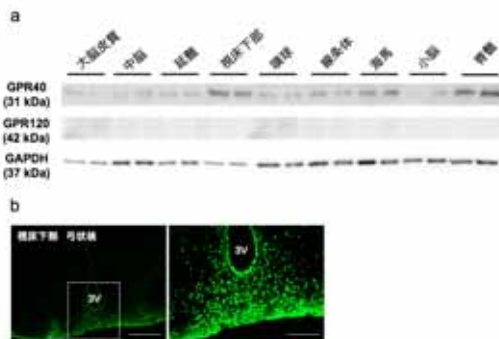


図 3 GPR40 のタンパク質発現とその局在解析
(a) 脳各部位における GPR40 タンパク質発現解析 (b) 視床下部弓状核における GPR40 の局在 (b)

次に、中枢神経系に発現している GPR40 が疼痛制御機構に関与しているかについて、GPR40 および GPR120 の選択的アゴニスト GW9508 および DHA を用いて検討を行ったところ、ホルマリン試験において GW9508 の脳室内投与はホルマリン誘発疼痛行動を用量依存的に抑制することを明らかにした

(図 4a, b)。

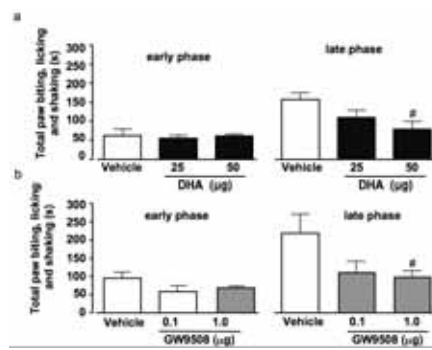


図 4 ホルマリン試験における GPR40 アゴニスト (DHA および GW9508) の抗侵害作用

さらに、この疼痛行動の抑制はオピオイド受容体拮抗薬や抗 β -エンドルフィン抗血清の前処置によって有意に抑制されることから、これらの機序に、オピオイド神経系が関与している可能性も示唆された。さらに、 β -エンドルフィンの免疫組織学的検討より、DHA および GW9508 を脳室内投与後に視床下部弓状核において β -エンドルフィン陽性領域の増加が認められた。したがって、GPR40 が β -エンドルフィンの分泌に関与している可能性が示唆される。これらの結果より、DHA による抗侵害作用の発現には脳内 GPR40 を介した β -エンドルフィンの遊離が関与している可能性が示された。さらに、脳内 GPR40 が疼痛制御機構を担う新たな標的分子となる可能性が示された(図 5)。

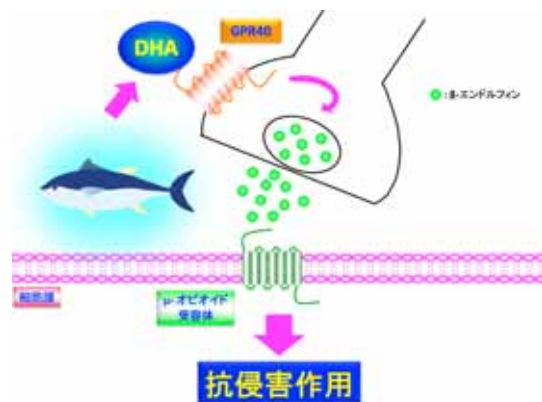


図 5 DHA の抗侵害作用機序における GPR40 を介した抗侵害作用機序仮説

最後に、本研究を行うことにより、DHA は β -エンドルフィンの遊離を介して間接的にオピオイド受容体へ作用し、抗侵害作用を示すことを明らかにした。さらに、長鎖脂肪酸受容体 GPR40 を介した疼痛制御機構の可能性について示した。

現在、脂肪酸が疼痛の惹起や制御において、重要な役割を果たしている事が明らかになりつつある。そのような状況の中で、本研究成果は生体内の脂肪酸あるいは脂肪酸受容体が、疼痛制御機構に新たに関与している可能性を示した。

現在、慢性疼痛に苦しんでいる患者数は2,000 万人以上とされており、新たな鎮痛薬の開発のために、慢性疼痛制御機構の解明に関する研究が急がれている。現在、我々も慢性疼痛モデル動物における GPR40 の関与について検討中である。

DHA を含む *n*-3 系 PUFA は、既に種々の生理・薬理作用に関して、幅広い観点からの研究がなされており、その安全性も確立していることから、様々な領域における臨床応用が期待される。脂肪酸あるいはその受容体をキーワードにして、難治性疼痛の発症機構の解明、それに対する新しい診断バイオマーカーの同定や個別化医療に貢献できる可能性が期待され、今後、本領域の研究が広く普及することを願う次第である。

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 5 件)

1. Nakamoto K, Nishinaka T, Matsumoto K, Mankura M, Tokuyama S. Involvement of the long-chain fatty acid receptor GPR40 as a novel pain regulatory system. *Brain Res.* 2012, 13,

1432:74-83. 査読有り

2. 徳山尚吾, 中本賀寿夫, 新規疼痛制御物質としての不飽和脂肪酸の現状と今後の展望, *日本緩和医療薬学雑誌*, 総説, 2011, 4, 45-51. 査読有り
3. Tokuyama S and Nakamoto K. Unsaturated fatty acid and pain. *Biol. Pharm. Bull.*, Review, 2011, 34, 1455-1464. 査読有り
4. Nakamoto K, Nishinaka T, Ambo A, Mankura M, Kasuya F, Tokuyama S., Possible involvement of β -endorphin in docosahexaenoic acid-induced antinociception. *Eur. J. Pharmacol.*, 2011; 666, 100-104. 査読有り
5. Nakamoto K, Nishinaka T, Mankura M, Fujita-Hamabe W, Tokuyama S. Antinociceptive effects of docosahexaenoic acid against various pain stimuli in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 2010, 33, 1070-1072. 査読有り

[学会発表](計 16 件)

1. 松本健吾, 西中崇, 中本賀寿夫, 万倉三正, 徳山尚吾, 長鎖脂肪酸受容体 GPR40 を介した新規疼痛制御機構の関与と慢性疼痛時におけるその受容体発現変化, 日本薬学会 第 132 年会, 2012 年 3 月 28-31 日, 札幌
2. 西中崇, 松本健吾, 中本賀寿夫, 安保明博, 万倉三正, 小山豊, 徳山尚吾, ドコサヘキサエン酸による抗侵害作用の発現機序の解明, 日本薬学会 第 132 年会, 2012 年 3 月 28-31 日, 札幌
3. 中本賀寿夫, 西中崇, 松本健吾, 万倉三正, 小山豊, 徳山尚吾. 新規疼痛制御機構系としての長鎖脂肪酸受容体 GPR40 の関与, 第 85 回日本薬理学会年会, 京都, 2012 年 3 月 14-16 日.
4. Takashi Nishinaka, Kengo Matsumoto, Kazuo

- Nakamoto, Akihiro Ambo, Mitsumasa Mankura, Shogo Tokuyama, Antinociceptive effects of docosahexaenoic acid via activation of the opioidergic systems. *Neuroscience* 2011. 11.12-18, 2011 in Washington DC
5. 中本賀寿夫, 西中崇, 松本健吾, 万倉三正, 徳山尚吾, 長鎖脂肪酸受容体 GPR40 を介した抗侵害作用とそれにおける β -エンドルフィンの関与, 第 41 回 日本精神神経薬理学会, 2011 年 10 月 27-29 日, 東京
 6. 中本賀寿夫, 西中崇, 松本健吾, 万倉三正, 徳山尚吾, 長鎖脂肪酸受容体 GPR40 を介した新たな疼痛制御機構の可能性, 第 5 回 緩和医療薬学会 2011 年 9 月 23-24 日, 幕張
 7. 西中崇, 松本健吾, 中本賀寿夫, 万倉三正, 徳山尚吾, ドコサヘキサエン酸による抗侵害作用の基礎的検討, 第 22 回霧島神経薬理フォーラム, 2011 年 8 月 19-21 日, 蒜山
 8. 松本健吾, 西中崇, 中本賀寿夫, 万倉三正, 徳山尚吾, ドコサヘキサエン酸の抗侵害作用発現における GPR40 の関与, 第 119 回 日本薬理学会近畿部会, 2011 年 7 月 9 日, 名古屋
 9. Kazuo Nakamoto, Takashi Nishinaka, Wakako Fujita (Hamabe), Shogo Tokuyama. Possible involvement of opioidergic nerve systems on antinociceptive effect of DHA. The International Narcotics Research Conference 2011, Florida, USA, June 21-25, 2011.
 10. 西中崇, 中本賀寿夫, 万倉三正, 徳山尚吾, ドコサヘキサエン酸による β -エンドルフィン遊離機構の基礎的検討, 第 131 回日本薬学会年会, 2011 年 3 月 28-31 日, 静岡
 11. 中本賀寿夫, 西中崇, 松本健吾, 万倉三正, 徳山尚吾, ドコサヘキサエン酸の抗侵害作用における β -エンドルフィンの関与, 第 84 回日本薬理学会年会, 2011 年 3 月 22-24 日, 横浜
 12. 中本賀寿夫, 西中崇, 松本健吾, 万倉三正, 徳山尚吾, 新規疼痛制御物質としてのドコサヘキサエン酸の基礎的検討, 第 20 回神経行動薬理若手研究者の集い, 2011 年 3 月 21 日, 東京
 13. 中本賀寿夫, 西中崇, 安保明博, 万倉三正, 徳山尚吾, 新規疼痛制御物質としてのドコサヘキサエン酸に関する基礎的検討, 日本薬学会 近畿学術大会, 2010 年 10 月 30 日, 大阪
 14. Kazuo Nakamoto, Takashi Nishinaka, Wakako Fujita (Hamabe), Shogo Tokuyama. Possible involvement of opioidergic nerve systems on antinociceptive effect of DHA. The International Narcotics Research Conference 2010, Malmö, Sweden, July 11-16, 2010.
 15. 西中崇, 中本賀寿夫, 安保明博, 万倉三正, 徳山尚吾, ドコサヘキサエン酸の抗侵害作用における β -エンドルフィンの関与, 第 31 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム, 2010 年 8 月 26-27 日, 名古屋
6. 研究組織
- (1)研究代表者
- 中本 賀寿夫 (NAKAMOTO KAZUO)
神戸学院大学・薬学部・助教
研究者番号 : 30432636