

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790576

研究課題名(和文)線維筋痛症モデルを用いた脂質制御機構解明およびエピジェネティクス機構の関与の証明

研究課題名(英文)Lipids and epigenetic silencing machinery in an experimental mouse model of fibromyalgia

研究代表者

永井 潤(Nagai, JUN)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：20608369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：申請者が確立してきた線維筋痛症(FM)モデルでは、下降性抑制を介したモルヒネ鎮痛が減弱している。神経障害性疼痛時のモルヒネ鎮痛欠如にはMOP遺伝子のエピゲノム性発現低下が観察されるが、FMモデルでの責任脳領域においてMOP遺伝子変化は観察されなかったことから、異なる機構を介することが示唆された。一方、脂質メディエーターは痛みの制御因子として知られており、TOF-MSやLC-MS/MSを用いた発痛および鎮痛脂質メディエーターの定量系の確立に成功した。本定量系を用いた下降性抑制機構に関わる複数の領域での発痛メディエーター量には変化はないため、上行性あるいは情動系等の他の経路の関与が強く示唆された

研究成果の概要(英文)：In fibromyalgia, using the intermittent cold stress (ICS) mouse model, the loss of descending activation system seems to be a key mechanism underlying the absence of morphine analgesia. In neuropathic pain, absence of morphine analgesia is induced by down-regulation of MOP gene through epigenetic silencing mechanism. In FM model, MOP gene level was not altered. On the other hand, it has long been known that lipid mediators are key regulators of pain perception. We have successfully established quantitative analytical methods for proalgesic and analgesic lipid mediators using LC-MS/MS and TOF-MS techniques. We quantified lipid mediator levels in the selected brain regions along the pain descending pathway. Our data did not indicate a significant alteration in the lipid levels of the brain regions investigated. These results suggest that fibromyalgia is different from the neuropathic pain, at least in terms of lipid metabolism and epigenetic silencing mechanism.

研究分野：医歯薬学

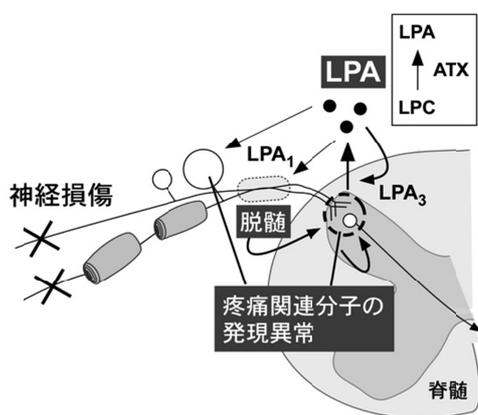
科研費の分科・細目：境界医学 疼痛学

キーワード：線維筋痛症 リゾリン脂質 LC-MS/MS TOF-MS 慢性疼痛 下降性抑制 エピゲノム オピオイド

### 1. 研究開始当初の背景

(1)脂質メディエーターが痛みの制御因子であることは、よく知られた事実であり、所属研究室では、代表的な難治性疼痛疾患である末梢神経障害性疼痛の原因分子として、リゾホスファチジン酸(LPA)を同定した(Nature Medicine, 2004)。この分子は、神経障害時に新規に脊髄で産生され、逆行性シグナルとして、LPA<sub>1</sub>受容体に作用し、知覚神経線維の脱髄とそれに続く神経回路の再編成やカルシウムチャンネル Ca<sub>v</sub> 2<sup>-1</sup>等の痛み関連遺伝子群の発現変動を介して神経障害性疼痛を誘発する(Mol Pain, 2008, Review)。さらに、LPAはLPA<sub>3</sub>受容体やミクログリアを介して、LPA産生の増大を誘発することを見出した(図1)。

図1.神経障害性疼痛時のLPA機構



(2)臨床での慢性疼痛病態においては、疼痛過敏やアロディニアといった陽性症状に加えて、慢性的な知覚鈍麻や疼痛鈍麻にみられる逆説的な陰性症状が生じることも知られており、所属研究室ではこの陰性症状の仕組みに関して長期的な遺伝子発現抑制制御機構としてエピジェネティクス機構に着目し、サイレンサー遺伝子である NRSF (neuron-restrictive silencer factor) を介した遺伝子発現抑制制御が疼痛鈍麻やモルヒネ鎮痛抵抗性の原因となることを見出している。

(3)線維筋痛症は女性に優位に発症する、原因不明の全身性疼痛疾患である。これまでに、酸性食塩水の筋肉内注射や迷走神経部分切除などの種々の動物実験モデルが提案されてきたが、薬物感受性などの観点において、ヒト病態を反映していないという問題点が挙げられる。最近、著者らは、繰り返しストレス負荷による線維筋痛症モデル(ICSモデル)を独自に作製し、雌性優位な全身性疼痛および薬物感受性の観点において、本モデルがヒト病態をよく反映することを見出している(Mol Pain, 2008; Neurosci Lett, 2010)。しかしながら、この線維筋痛症病態の分子メカニズムは依然として不明のままである。

### 2. 研究の目的

本研究計画では、線維筋痛症(FM)の病態分子機構を解明するために、所属研究室で確立した線維筋痛症モデルマウスを用いて、陽性症状に関しては、LPAを中心とした脂質代謝機構の観点から解析を行い、モルヒネ鎮痛欠如等の陰性症状に関しては、エピゲノム性遺伝子発現制御の観点から神経障害性疼痛(NP)と比較検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1)FMモデルマウスの作製

繰り返し寒冷ストレス(ICS)モデル：マウスを夜間は低温で飼育し、昼間は30分ごとに室温(24℃)と低温(4℃)に変化させる環境を2日間繰り返す。

#### (2)神経障害性疼痛モデルの作製

マウスにペントバルビタール麻酔下、片側後肢部分の皮膚を切開し、露出させた坐骨神経の半分を縫合針を通してすくいあげ、縫合糸で完全に結紮し、切開部分を縫合する。

#### (3)疼痛試験評価方法

使用するマウスは、実験の1-2時間前から透明ガラス板上に置き上から透明ケージをかぶせて実験環境に慣れさせてから実験を行った。測定には Thermal stimulator を使い、マウスの右後肢足蹠に対して一定の熱刺激を加えた時に逃避反応を示すまでの潜時時間(sec)を閾値(PWL; Paw withdrawal Latency)として評価する。

#### (4)MALDI-TOF-MSを用いたLPA定量法

MALDI-TOF-MS法を用いたLPA定量には、文献(Rapid Commun Mass Spectrom 2010, 24, 1075)に従って、LPAをtag化修飾し、定量解析を行う。

#### (5)LC-MS/MSを用いたLPA定量法

脳組織にメタノールを加え、超音波破碎し、遠心繰り返し後、上清を回収し、Duo-filterを通過させ、抽出サンプルとする。液体クロマトグラフィー(LC)については、水相(水溶液の5mMギ酸アンモニウム)と有機相(アセトニトリル溶媒の5mMのギ酸95%(v/v))を用いる。MS/MS分析には、一般定量分析用トリプル四重極質量分析計を用いる。LPAはネガティブモードで測定し、MS/MSスペクトルでm/z 153のピークを測定する。

#### (6)リアルタイムPCR法

脳組織を TRIzol 試薬中でホモジナイズし、Total RNAの抽出は TRIzol 試薬製品文書プロトコールに従って行う。500 ngの total RNA について、random primer と SuperScriptIII reverse transcriptase を用いて逆転写反応を行い、cDNA を作製する。リアルタイム PCR 反応には、qPCR MasterMix Plus for SYBR® Green I を使用して行う。

#### 4. 研究成果

##### 1) 線維筋痛症(FM)における脂質代謝

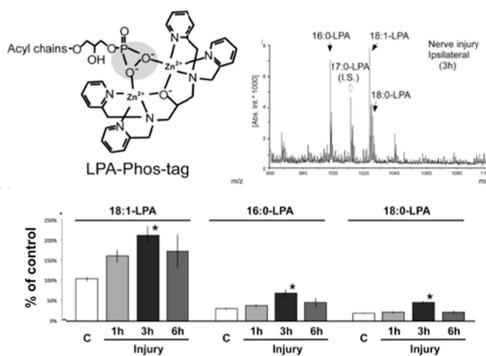
1-1) NP では産生上昇したリゾホスファチジン酸(LPA)がカルシウムチャンネル  $Ca_v 2^{-1}$  発現上昇することが知られており、その阻害剤プレガバリンの薬理作用機序となっている。そこで、FM モデルマウスに対し、プレガバリンの脳室内投与(0.1-1  $\mu\text{g}$ )を行い、経時的に疼痛閾値を測定したところ、用量依存的な疼痛閾値の上昇が観察され、投与 180 分後においても鎮痛効果は持続していた。特に 1  $\mu\text{g}$  投与群に関しては数日間におよぶ長期的な鎮痛効果が観察された。

1-2) 臨床では下降性の疼痛抑制機構が減弱していることから、本研究では複数の責任脳領域で、リアルタイム PCR 解析法により  $Ca_v 2^{-1}$  の遺伝子発現を測定したが、現時点で有意な変化は観察されなかった。

1-3) LPA 産生上昇のために LPA 定量方法の確立を行った。LPA のリン酸残基を Phos-Tag で標識することにより間接的な値として評価する方法を TOF-MS 法で確立した。この方法を用いて、これまでバイオアッセイで定量した LPA について、分子種ごとに同定した定量解析が可能となった。

1-4) この TOF-MS 法を用いて、末梢神経障害後に脊髄で上昇する LPA 産生は定量的に再現され、神経障害 3 時間後に産生がピークに達することが明らかとなった。特に 18:1-LPA が他の分子種に比べて量的に多かった(図 2)。

図 2. MALDI-TOF-MS を用いた LPA 定量法

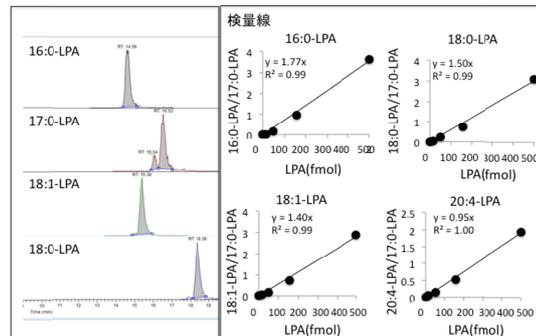


1-5) 脊髄で上昇する LPA 分子種の LPA1 受容体と LPA3 受容体への作用を検討したところ、18:1-LPA が LPA1 および LPA3 に対して作用が強いことがカルシウムアッセイで明らかとなったことから、神経障害性疼痛の主要な責任分子であることが示唆された。

1-6) さらに、上記の手法を用いて、LPA 合成に重要な役割を果たすと考えられている LPA 誘発性 LPA 産生機構に LPA3 受容体やミクログリアの関与を証明し、特にミクログリア介在性の鍵分子として、II-1 を同定した。

1-7) しかしながら、MALDI-TOF-MS 法による LPA 定量解析は脳において感度的に困難であった。そこで、本研究ではさらに様々な条件検討を行った結果、より単純にメタノール抽出し、そのまま LC-MS/MS に適応できる条件を見出すことに成功した(図 3)。検出感度は 1 mg wet tissue 脳組織であり、マウス脳の特殊領域のいずれでも測定することが可能となった。

図 3. LC-MS/MS を用いた LPA 定量法



1-8) 上記の LC-MS 法を用いて、FM モデルマウスにおける下降性抑制機構に関連する複数の責任脳領域における LPA 測定を行ったが、現在のところまだ有意な変化を観察するには至っていない。

##### 2) 線維筋痛症(FM)におけるエピゲノム性遺伝子発現制御

2-1) NP では LPA 産生とは別にエピゲノム性遺伝子制御が観察されることが知られている。特に神経障害後の鈍麻と末梢性モルヒネ鎮痛欠如に関連して責任分子として Nav1.8 と MOP 遺伝子の長期間の発現低下が報告されている。この点に関して FM モデルで検証を行った時、ニューロメーターを用いた感度良く、刺激線維の選択性を評価できる実験系において NP とは異なり C 線維の疼痛鈍麻は観察されなかった。従って、この点において Nav1.8 との関連については解析しなかった。

2-2) FM モデルでは脳室内へのモルヒネ投与による下降性疼痛機構が消失しており、この点においては NP とは全く異なっていた。そこで、その主な役割を担う責任脳領域において MOP 遺伝子発現を測定したが有意な変化は観察されなかった。

以上のことから、FM モデルは脂質代謝やエピゲノム性遺伝子発現制御機構において、NP とは全く異なるモデルであることが証明された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

植田弘師, 永井潤  
リゾホスファチジン酸  
痛みの診療シリーズ、36-37, 文光堂, 2014  
査読無

Ma L\*, Yano R\*, Nagai J (\*Equal contributed), Ueda, H;  
Interleukin-1 Plays Key Roles in LPA-Induced Amplification of LPA Production in Neuropathic Pain Model. *Cell Mol Neurobiol.* 2013 Nov;33(8):1033-41.  
Doi:10.1007/s10571-013-9970-3. 査読有

Ma L\*, Nagai J (\*Equal contributed), Chun J., Ueda H;  
An LPA species (18:1 LPA) plays key roles in the self-amplification of spinal LPA production in the peripheral neuropathic pain model. *Mol Pain* 17(9), 1, 2013. 査読有

Miyabe Y, Miyabe C, Iwai Y, Takayasu A, Fukuda S, Yokoyama W, Nagai J, Jona M, Tokuhara Y, Okawa R, Ova H, Aoki J, Chun J, Yatomi Y, Ueda H, Miyasaka M, Miyasaka N, and Nanki T;  
Necessity of lysophosphatidic acid receptor 1 for development of arthritis. *Arthritis & Rheumatism.* 65(8), 2037, 2013.  
Doi: 10.1002/art.37991. 査読有

植田弘師, 永井潤  
慢性疼痛創薬標的としてのリゾホスファチジン酸、  
遺伝子医学MOOK 24(メディカルドゥ)  
ISSN 1349-2527, 2013. 査読無

Ueda H, Matsunaga H, Olaposi OI, Nagai J; Lysophosphatidic acid: Chemical signature of neuropathic pain. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1831(1), 61-73, 2013  
Doi: 10.1016/j.bbali.2012.08.014. 査読有

植田弘師, 永井潤  
神経障害性疼痛における生理活性脂質 LPA の生合成機構および病態機能  
ペインクリニック 33(11) (真興交易): 1575-1583, 2012. 査読無

Ma, L., Nagai J, J., Sekino, Y., Goto, Y., Nakahira, L., Ueda, H.  
Single application of A2 NTX, a botulinum toxin A2 subunit, prevents chronic pain over long periods in both diabetic and

spinal cord injury-induced neuropathic pain models. *Journal of Pharmacological sciences.* 119(3) 282-286, 2012  
Doi: 10.1254/jphs.12080SC. 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

永井潤、植田弘師  
パクリタキセル誘発性神経障害性疼痛における LPA 合成と脱髄機構  
第 36 回日本疼痛学会、2014 年 6 月 20 日、大阪 (発表確定)

永井潤、植田弘師  
質量分析計を用いた神経障害性疼痛におけるグリア介在性リゾホスファチジン酸合成の定量  
第 86 回 日本薬理学会年会、2013 年 03 月 22 日、福岡

永井潤、植田弘師  
慢性疼痛とリゾホスファチジン酸について  
第 4 回 長崎疼痛フォーラム、2013 年 02 月 14 日、長崎

永井潤、植田弘師  
JNK/c-jun シグナル伝達を介するリゾホスファチジン酸誘発性脱髄機構  
第 54 回日本脂質生化学会、2012 年 06 月 08 日、福岡

〔その他〕  
ホームページ等

<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/soyakuuri/index-j.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井潤 (NAGAI, Jun)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号: 20608369