

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26253077

研究課題名(和文) LPAプライミングとiPS細胞を用いた慢性疼痛病態神経回路要素の再構成と創薬

研究課題名(英文) Reproduction of chronic pain model through a reconstitution of neuronal circuit components including LPA priming and iPS cells, and its application for drug discovery

研究代表者

植田 弘師 (UEDA, Hiroshi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・教授

研究者番号：00145674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,100,000円

研究成果の概要(和文)：LPAシグナルは神経障害性疼痛、線維筋痛症モデルの形成と維持機構の共通鍵分子である事を明らかにし、創薬標的分子に対する阻害剤探索やin silico解析、最適化合成を行った。慢性疼痛は免疫系を含む複数のフィードフォワード機構により構成されることを見出したので、特異的薬剤処置やLPAプライミングした培養アストロサイト、iPS細胞、T細胞をin vivo疼痛機構に再構成する研究を実施した。その結果、ミクログリアLPA3受容体-サイトカインによる形成・維持機構、アストロサイトLPA1受容体-ケモカインによる維持機構が主な仕組みであることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We clarified that LPA signals play roles in the development and maintenance of various types of neuropathic pain models and various types of fibromyalgia models. We then performed the high throughput and in silico screening of inhibitors and their chemical optimizations, and successfully obtained biochemical tools to clarify molecular mechanisms underlying chronic pain and therapeutic lead compounds for drug development. As chronic pain was found to comprise of multiple feed-forward systems including immune system, we performed the in vivo reconstitution of LPA-primed cells (microglia, astrocytes, iPS cells, T-cells). From these studies, we found LPA3-microglia-cytokine and LPA1-astrocytes-chemokine production are involved in the development and maintenance of chronic pain, respectively.

研究分野：薬理学

キーワード：脂質メディエーター LPA受容体 神経障害性疼痛 線維筋痛症 フィードフォワード機構 in vivo再構成 ミクログリア アストロサイト

1. 研究開始当初の背景

20年以上の慢性疼痛の研究から、分子病態の一部が解明され、米国型のアカデミア創薬の成果も出つつあるが、その戦略は疼痛症状の緩解にとどまっている。本研究者は末梢神経障害による神経障害性疼痛モデルから原因分子リゾホスファチジン酸(LPA)を発見した(Nature Med. 2004)が、近年の研究からLPAは種々の神経障害性疼痛や線維筋痛症など、大半の慢性疼痛についてもLPA受容体の関与を示唆する事実を見出しつつある。興味ある事実は、こうした慢性疼痛の形成のみならず維持機構にもLPAシグナルは関与するという知見を得つつあることである。一連の予備的研究成果をもとに慢性疼痛機構がLPAシグナルを中心としたフィードフォワードシステムにより形成できることを提案した。その根拠となる知見は、1)末梢神経障害による慢性疼痛では、知覚神経における疼痛関連分子の発現変化と脱髄等・スプラウティングによる脊髄入力増幅(疼痛過敏)とシナプス入力の再構築による質的变化(アロディニア)、2)脊髄レベルにおけるLPAシグナルによるグリア細胞活性化による脊髄後角神経応答可塑性などが、LPA産生増幅に関連すること、3)LPAによるミクログリアでのBDNF産生は神経KCC2発現を低下させることでGABA受容体応答を抑制から興奮性に変換させる(GABAスイッチ)と関連する、などである。こうしたメカニズムにはLPA1やLPA3受容体が関与するが、とくにLPA産生増幅機構にはLPA3受容体の関与が鍵的な役割を果たしている。申請者らは、その他多くの神経障害性疼痛モデルや情動性疼痛モデルにおいてもLPA1とLPA3受容体の関与を示す予備的知見を得ていることから、LPAシグナル制御物質は慢性疼痛の形成の検証ならびに維持機構と関連する治療効果に直結するものと期待された。LPAシグナル制御薬はこれまでの対症療法とは異なり根治療法に直結する可能性がある事から、具体的な創薬標的として期待されるのはLPAシグナル制御薬としての受容体拮抗薬、LPA合成酵素阻害剤、慢性疼痛維持期に関与するグリア細胞におけるLPAシグナルの下流に位置する責任分子群である。

2. 研究の目的

本研究における最も重要なエンドポイントはLPAシグナル制御薬が慢性疼痛の根治療法となりうるか、そしてその創薬標的としてどのようなものが重要であるかを検証する事にある。より具体的には、

- (1) LPAシグナルを中心とする慢性疼痛フィードフォワードシステムについての各プロセスの実験的検証を行う、
- (2) その仮説のもととなった坐骨神経部分

結紮(pSNL)モデル以外の他の慢性疼痛病態モデルにおいてもLPAシグナルは共通して鍵分子としての役割を有することを検証する、

- (3) LPA1、LPA3のほかLPA5受容体が関与する責任細胞の検証とその拮抗薬の発見と化合物最適化研究を行う、

- (4) 病態特異的に関与するLPA合成酵素の発見とその阻害剤探索・化合物最適化研究を行う、

- (5) LPAシグナルの上下流に働くグリア細胞における責任分子を同定する、

- (6) LPAをプライミングした培養グリア細胞のin vivo中枢系における再構成実験と責任分子の同定を行う、

- (7) ヒトへの応用としてiPS由来グリア細胞における機能検証に挑戦する、

- (8) 線維筋痛症モデルにおける全身性疼痛の構成要因としての免疫T細胞の再構築研究の挑戦を行う、などである。

3. 研究の方法

- (1) 急性疼痛の代表としての完全フロイントアジュバント(CFA)炎症性疼痛モデルと慢性疼痛の代表としてのpSNLモデルの両モデルにおいてLPA産生能の相違についての検証を行った。各モデル作成後の時間経過ごとに脊髄後角を摘出しLC-MS/MS法を用いて内在性カンナビノイド分子2-archidonoyl glycerol(2-AG)と各分子種のLPA産生を定量比較した。

- (2) Paclitaxelのくり返し投与方法による化学療法剤中毒性、1型ならびにII型糖尿病モデルにおける末梢性神経障害性疼痛、脊髄損傷後、脳卒中後モデルにおける中枢性神経障害性疼痛におけるLPA1、LPA3受容体の関与ならびに脱髄、LPA産生についての評価を行った。

- (3) LPA受容体拮抗薬の創薬スクリーニングについて東京大学化合物ライブラリーを用いてハイスループットスクリーニング(HTS)を行った。LPA1受容体については結晶解析が完成したS1P受容体のホモロジーモデリング解析および結晶解析報告後はその結晶モデルを用いて分子動力的シミュレーション解析を行った。同様にin silico解析を含めたLPA受容体拮抗薬の合成最適化を行った。

- (4) LPA合成はホスホリパーゼPLA2類とオートタキシン(ATX)の2段階によるが、多様性の高いPLA2について既存の入手可能な阻害剤による疼痛への影響を解析すると共に、cPLA2、iPLA2、sPLA2の合計20種類以上の遺伝子発現についてpSNLモデルでの遺伝子発現の時間経過を測定し、候補となる酵素について、リコンビナント酵素を用いた酵素活性評価系を確立し、種々の化合物ライブラリーを用いて阻害剤のHTSを行い、合成最適化も行った。

(5) 神経障害性疼痛形成期ならびに維持期における LPA 産生と LPA 作用に関与するミクログリアならびにアストロサイトの役割を検証し、責任分子の解析を行った。

(6) マウス新生仔大脳から培養アストロサイトを調製し、デュッシュ内へ LPA を添加プライミングし、洗浄後、脊髄くも膜下腔へ投与し、疼痛惹起を検証した。一方、その培養細胞に発現する LPA 受容体、サイトカインやケモカインレベルを解析し、LPA 添加と LPA1/3 拮抗薬による発現に対する影響を解析した。

(7) ヒト iPS 由来のアストロサイトを購入し、同様に LPA プライミングしたのち LPA 受容体、サイトカイン、ケモカインへの影響を観察すると共に、脊髄くも膜下腔へ投与し、疼痛惹起能の検証を行った。

(8) 各種線維筋痛症はくり返しストレスを必要とすること、病態時の末梢血に LPA 産生が認められことから、免疫系の関与を知るために LPA をプライミングしたのち静脈注射により疼痛検定を行った。

4. 研究成果

(1) pSNL 後数時間において脊髄後角の LPA 産生は時間依存性に検出されたが、CFA モデルでは顕著な増加は観察されなかった。2-AG については CFA モデルでは増加が観察されたが、pSNL モデルでは初期のみ観察され、LPA 産生が観察される時間帯ではむしろ抑制される傾向にあった。この結果は pSNL モデルにおける疼痛過敏は LPA1 受容体欠損マウスで消失するが、CFA モデルの疼痛過敏は顕著な影響が観察されなかったことと同方向であることが明らかになった。

(2) Paclitaxel モデルにおける慢性疼痛は LPA1 と LPA3 KO マウスにおいて消失し、LPA1/3 拮抗薬を当初から適用した場合にも同様に遮断された。このモデルでは pSNL と同様に脊髄後根における脱髄が観察され、同様に LPA1、LPA3、ATX の遺伝子欠損マウスにおいても遮断された。この脱髄に関する仕組みは pSNL と同様にカルパインが関与する事を阻害剤実験により検証できた。Paclitaxel モデルでは LPA 産生の増加も確認され、LPA1 と LPA3 遺伝子欠損マウスにおける消失も確認できた。同様に糖尿病モデルや脊髄損傷後における疼痛過敏についても LPA1 遺伝子欠損マウスにおける消失の確認ができた。また、脳卒中後モデルについては新たにローズベンガルを用いた血栓性脳梗塞モデルを作成し、tPA との併用により増強される慢性疼痛モデルシステムを完成し、その慢性疼痛は LPA 受容体 KO マウスにおいて消失することも確認できた。

(3) LPA1 受容体の分子動力的シミュレーション解析から、これまで報告されてきた LPA 受容体拮抗薬の atomistic な作用部位が異なることが明らかとなり、アロステリックモデレーター発見の手がかりが得られた。LPA2 や LPA3 受容体についても同様な解析を行い、合成最適化研究に役立てた。

(4) 慢性疼痛における cPLA2、iPLA2 ならびに sPLA 2, ATX は慢性疼痛の形成期、維持期のいずれかにそれぞれ有意な役割を果たす事が確認されたので、その候補分子種について蛍光剤 Bodipy を用いた FRET システムを用いたアッセイシステムを完成した。in silico スクリーニングとこのアッセイシステムを用いた HTS からヒット/リード化合物を発見し、それらの中には in vivo 全身投与でも疼痛治療活性を有する例を見出すことに成功した。このうち数種の創薬標的酵素については合成最適化ののちに経口投与によっても疼痛治療を可能とする化合物を見出すことに成功し、PK/PD 的にも優れている事が確認された。

(5) 神経障害性疼痛形成期ならびに維持期においてミクログリアならびにアストロサイトの阻害剤（細胞毒素）による疼痛抑制、LPA 産生を解析したところ、LPA 産生増幅には主にミクログリア由来のサイトカインが関与し、産生された LPA はアストロサイト活性化を介して疼痛過敏に関与する事が明らかになった。こうした阻害剤の特異性はマウス脊髄から組織を摘出し分散後フローサイトメトリー (FACS) を用いて特異的なミクログリア、アストロサイトについての細胞マーカーを指標としてその選択的毒性を検証することにも成功した。

(6) マウス新生脳由来培養アストロサイトには LPA 受容体のうち主に LPA1 と LPA6 が発現することが明らかになった。この培養細胞に 10 microM 濃度の LPA を添加したが、6 時間後の受容体遺伝子発現には影響が観察されなかった。LPA 添加は複数のケモカインの発現を有意に増加させ、LPA1/3 拮抗薬添加により有意に遮断されたが、代表的な IL-1beta をはじめとするサイトカイン類の発現には影響が観察されなかった。そこで、LPA をプライミングしたアストロサイトを洗浄調製したものを脊髄くも膜下腔へ投与したところ疼痛惹起が確認され、その効果は LPA1/3 拮抗薬により遮断された。LPA プライミングにより LPA 受容体刺激を介して発現上昇した特定のケモカインは pSNL モデル作成後 2 週間において脊髄後角に免疫組織化学的に発現上昇が確認され、この変化は In Cell アナライザーを用いた定量解析においても有意差が確認され、さらにこの変化は LPA1/3 受容体拮抗薬により有意に遮断された。

(7)ヒト iPS 由来のアストロサイトを 7 日間培養した後、LPA 受容体発現を測定したとき、LPA2, LPA6 の高発現は確認されたが、LPA1, LPA3 の有意な発現は観察されなかった。また 10 microM 濃度の LPA 添加を行った時にもその受容体発現に変化は観察されなかった。しかも LPA 添加によりケモカイン量を定量したとき、CCL5, CXCL1, CXCL12 等代表的なケモカインの遺伝子発現上昇は観察されなかった。また、LPA をプライミングしたヒト iPS 由来のアストロサイトをマウス脊髄くも膜下腔へ投与した時にも著明な疼痛過敏は観察されなかった。マウスとヒト iPS の間に見出された相違の理由の一つとして種差の問題が含まれている可能性はある。しかし、今回用いたアストロサイトへ分化させた iPS 由来細胞の表現型に課題がある可能性も除外できない。今後は、異なる種類の iPS 由来アストロサイトを用いた研究において、LPA1 受容体の発現が確認されるものがあれば、それにより再検討する必要がある。その他の要因として、神経系ネットワークに存在するアストロサイトは様々な異種細胞由来の生理活性物質によりプライミングされている可能性もあることから、ヒト iPS 由来アストロサイトをそうしたネットワーク環境を再現する共培養系あるいは関連生理活性物質存在下において検証する事も必要である。

(8)ヒト型 T リンパ球様細胞 (H9 細胞) では LPA2 や LPA6 受容体が発現することが確認された。LPA を添加したが、サイトカインやケモカイン発現には顕著な影響は確認されず、LPA プライミングした H9 細胞の静脈内注射によっても疼痛過敏は確認されなかった。

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 13 件)

1. Mukae T, Fujita W, Ueda H: P-glycoprotein inhibitors improve effective dose and time of pregabalin to inhibit intermittent cold stress-induced central pain. *J Pharmacol Sci*. 査読有 131: 64-67 2016 DOI: 10.1016/j.jphs.2016.01.002
2. Tsukahara R, Ueda H: Myelin-related gene silencing mediated by LPA1 - Rho/ROCK signaling is correlated to acetylation of NF κ B in S16 Schwann cells. *J Pharmacol Sci*. 査読有 132: 162-165 2016 DOI: 10.1016/j.jphs.2016.07.010
3. Mukae T, Uchida H, Ueda H: Donepezil reverses intermittent stress-induced generalized chronic pain syndrome in mice. *JPET*. 査読有 353: 471-479 2015

- DOI: 10.1124/jpet.114.222414
4. Uchida H, Matsushita Y, Araki K, Mukae T, Ueda H: Histone deacetylase inhibitors relieve morphine resistance in neuropathic pain after peripheral nerve injury. *J Pharmacol Sci*. 査読有 128(4):208-211 2015 DOI: 10.1016/j.jphs.2015.07.040
5. Omotuyi OI, Nagai J, Ueda H: Lys39-Lysophosphatidate Carbonyl Oxygen Interaction Locks LPA1 N-terminal Cap to the Orthosteric Site and partners Arg124 During Receptor Activation. *Scientific Reports* 査読有 5(13343) 2015 DOI: 10.1038/srep13343
6. Ueda H, Uchida H: Epigenetic Modification in Neuropathic Pain. *Curr Pharm Des*. 査読有 21(7) 849-67 2015 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Epigenetic+Modification+in+Neuropathic+Pain++ueda>
7. 内田仁司, 植田弘師: Lysophosphatidic acid (LPA) と神経障害性疼痛. *痛みの Science&Practice* 8. 査読有 25-28 2015 http://www.bunkodo.co.jp/book/detail_1262.html
8. 植田弘師, 藤田和歌子: 慢性疼痛創薬の標的としてのリゾホスファチジン酸. *実験医学増刊 2015 年 9 月号*. 査読有 33(15)140-145 2015 <https://www.yodosha.co.jp/yodobook/book/9784758103497/>
9. Uchida H, Nagai J, Ueda H: Lysophosphatidic acid and its receptors LPA1 and LPA3 mediate paclitaxel-induced neuropathic pain in mice. *Mol Pain*. 査読有 10:71 2014 doi:10.1186/1744-8069-10-71
10. Sumitani M, Ueda H, Hozumi J, Inoue R, Kogure T, Ogata T, Yamada Y: Minocycline Does Not Decrease Intensity of Neuropathic Pain, but Improves Its Affective Dimension. *J Pain Palliat Care Pharmacother*. 査読有 1-6 2014 DOI: 10.3109/15360288.2014.1003674
11. 植田弘師, 内田仁司: 痛みによる epigenetic 修飾. *脳* 21. 査読有 17(2)23-27 2014 <http://www.kinpodo-pub.co.jp/shosai/o0165-vol17-2.html>
12. 植田弘師, 永井潤: リゾホスファチジン酸. *痛み診療キーポイント*. 査読有 5 36-37 2014 http://www.bunkodo.co.jp/book/detail_11194.html
13. Pavone F, Ueda H: Bridging the Gap Is BoNT/B useful for pain treatment? *PAIN*. 査読有 155(4)649-650 2014 DOI: 10.1016/j.pain.2014.01.004

[学会発表]

(計 71 件) ※招待講演 20 一般講演 51

1. Ueda H:Lysophosphatidic acid: a biochemical signature for neuropathic pain. *16th World Congress on Pain (IASP)* (特別講演: Plenary Lecture) 2016年9月26日パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
2. Ueda H:Neuropathic pain initiation and maintenance: the role of glial-mediated LPA signaling in neuropathic pain models. *16th World Congress on Pain (IASP)*(招待講演)2016年9月26日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
3. 植田弘師:LPA as chemical signature of neuropathic pain - mechanisms and therapeutic innovation. *FASEB Science Research Conference*(招待講演)2015年8月26日バンフ (カナダ)
4. 植田弘師:Pharmacotherapeutic innovation against LPA-mediated chronic pain. *14th International Conference (the Bioactive Lipid Mediators in Cancer Inflammation and Related Diseases)* (招待講演) 2015年7月13日 ブダペスト (ハンガリー)
5. Ueda H:Epigenetic mechanisms for pain:A novel approach to pain treatment. *IASP 15th World Congress on Pain*(招待講演)2014年10月10日ブエノスアイレス (アルゼンチン)

[図書] (計 2 件)

1. 植田弘師: 第V章 神経薬理 15. 鎮痛薬. 「*NEW 薬理学*」改訂第7版, 南江堂, pp359-370 2017
<http://www.nankodo.co.jp/g/g9784524261758/>
2. Ueda H, Uchida H: Lipid mediator LPA-induced demyelination and self-amplification of LPA biosynthesis in chronic pain memory mechanisms. *Bioactive Lipid Mediators, Springer*, (Chaptor16)p223-236 2015
<http://www.springer.com/us/book/9784431556688>

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 慢性疼痛の治療薬
発明者: 植田 弘師
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2015-050063
出願年月日: 2015年03月12日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 3 件)

1. 名称: 線維筋痛症の治療方法 Methods for treating chronic pain
発明者:植田 弘師
権利者: 同上
種類: アメリカ特許
番号: 米国特許: US9,265,751 B2
取得年月日: 2016年02月23日
国内外の別: 国外
2. 名称: 全身性疼痛症候群の治療または予防薬 Therapeutic or prophylactic agent for generalized pain syndrome
発明者:植田 弘師
権利者: 同上
種類: EP 特許
番号: EP 特許 EP2324852B1
取得年月日: 2015年07月08日
国内外の別: 国外
3. 名称: 全身性疼痛症候群の治療または予防薬
発明者:植田 弘師
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特許第 5692746
取得年月日: 2015年02月13日
国内外の別: 国内

[その他]

- ホームページ等
長崎大学院医歯薬学総合研究科創薬薬理学
分野ホームページ
<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/neuro/>
6. 研究組織
(1)研究代表者
植田 弘師 (UEDA, Hiroshi)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・教授
研究者番号: 00145674
 - (2)研究分担者
なし
 - (3)連携研究者
なし
 - (4)研究協力者
なし