

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11113

研究課題名(和文) カナビノイド由来の新たなプロスタグランジン合成経路とその疼痛メカニズムへの関与

研究課題名(英文) Role of cannabinoids in new prostaglandin synthesis and its involvement in pain mechanism

研究代表者

伊吹 京秀 (Ibuki, Takae)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90232587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、炎症性痛覚過敏症状に関与するプロスタグランジンE2(PGE2)合成に必須のアラキドン酸供給の分子機構解明を目的とした。従来アラキドン酸は膜リン脂質からフォスホリパーゼA2(PLA2)の作用により遊離しシクロオキシゲナーゼ(COX)の基質になると考えられていたが、今回別経路であるカナビノイド類経路のアラキドン酸合成経路の関与に着目した。マウス及びラット炎症モデルにおいて行動学的手法、免疫組織科学的手法、生化学的手法、分子生物学的手法を用いて研究を行なった。結果、炎症性疼痛における中枢アラキドン酸供給にカナビノイド系の関与は少ない可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は炎症性疼痛の発症、維持メカニズムを研究してきた。炎症局所で産生されたインターロイキン6(IL6)などのサイトカインが血行性に炎症情報を中枢神経血管内皮細胞に伝達、血管内皮細胞内でCOX-2依存性にPGE2を産生し、炎症に伴う全身症状を惹起することを明らかにした。COX阻害薬は鎮痛薬として汎用されているが、種々の副作用をもたらすため、今回理想的な創薬目的でアラキドン酸カスケード上流のカナビノイド系の関与を研究したが、カナビノイド系薬剤の鎮痛薬としての可能性は高いことがわかった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the molecular mechanism of arachidonic acid supply, which is essential for the synthesis of prostaglandin E2 (PGE2) involved in inflammatory hyperalgesia. It has been considered that arachidonic acid is released from membrane phospholipids by the action of phospholipase A2 (PLA2) and becomes a substrate for cyclooxygenase (COX), but in this study we focused on the involvement of another pathway of arachidonic acid supply via cannabinoids. Behavioral, immunohistochemical, biochemical and molecular biological methods were used to study in mouse and rat models of inflammation. Results have shown that arachidonic acid supply in the central nervous system during inflammatory hyperalgesia is less likely through cannabinoid synthesis.

研究分野：疼痛学

キーワード：prostaglandin cannabinoid inflammation hyperalgesia arachidonic acid cyclooxygenase pain

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非ステロイド性消炎鎮痛薬(NSAIDs)は鎮痛薬として汎用されているが、消化器系、腎尿路系、循環系をはじめとして種々の副作用が惹起される可能性があり時には重篤な結果に至ることがあるために、安全性の高い新規鎮痛薬の開発が急務である。NSAIDsの作用機序は、アラキドン酸カスケードにおいてシクロオキシゲナーゼ(COX)に作用しプロスタグランジン E2(PGE2)の合成を阻害するものである。

我々はこれまで炎症性疼痛の発症メカニズムを PGE2 に着目して研究してきた。炎症性疼痛モデルにおいて、中枢神経の興奮性増強に關与する PGE2 は誘導型 COX(COX-2)と mPGES-1 がアラキドン酸に作用することにより産生され、これらの酵素は中枢神経内の同一血管内皮細胞に共存していることを明らかにしたが、この報告は、従来の説と比較して PGE2 が脳、脊髄など痛覚情報処理経路の多彩な場所で作用することを説明できる非常に新しい知見として国際的に注目を浴びた。さらに炎症局所から中枢神経系にいたる炎症情報伝達分子候補として IL-6 などのサイトカインを同定し、中枢神経血管内皮細胞が情報伝達及び PGE2 産生が行われていることを発見した。従来アラキドン酸は膜リン脂質から PLA2 の作用により遊離し COX の基質になると考えられてきた。そこで炎症局所における PGE2 産生に關与する PLA2 を調べたところ、カルシウム非依存性 PLA2(iPLA2)であることを発見した。しかし iPLA2 活性を抑制したところ、炎症により惹起された PGE2 産生の抑制、痛覚過敏反応の抑制は有意ではあったが、抑制が 50%以内であり、iPLA2 以外にアラキドン酸産生に關わる別経路がある可能性を考え、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

炎症時に中枢神経系で合成される PGE2 は発熱や痛覚過敏に關与するが、この過程において基質となるアラキドン酸の供給メカニズムが不明であるので、解明を試みることを目的とする。近年、中枢神経系内で合成される膜リン脂質から PLA2 を介さない新たなアラキドン酸供給経路が Nomura らにより発見された。すなわち膜リン脂質から産生された 2-arachidonyl glycerol(2-AG)がアラキドン酸供給源となる。2-AG は内因性カナビノイドで、CB 受容体を介して作用を発揮する。2-AG はモノアシルグリセロールリパーゼ(MGL)により分解され、生じたアラキドン酸から PGE2 が産生される。本研究の目的は、この経路に着目して炎症性疼痛時における新たなアラキドン酸供給の分子機構を解明することにある。

3. 研究の方法

(*in vivo* 研究)

雄性 Lewis ラットの片側後肢に Freund 完全アジュヴァント(CFA)50 μ l を注射して炎症性痛覚過敏モデルを作成した。コントロール群には生理食塩水を注射した。行動試験として Ugo Basile 社の熱性痛覚過敏測定装置を用いて熱性痛覚過敏の経時的变化を 10 日間にわたり測定した。脳脊髄液中の PGE2 濃度の測定と、中枢神経系における COX-2、microsomal-type PGE synthase(mPGES-1)、mPGES-1 mRNA の局在を調べるために、あらかじめ決めた時点において深麻酔下でラットから検体を採取した。

(*ex vivo* 研究)

CFA 注射の 24 時間後にラットにイソフルランで深麻酔を行い、左室から HEPES-Ringer solution(HRS)で灌流した。その後脳組織の試料は HPS 中に冷中保存した。脳表面の血管は実体顕微鏡下で剥離し、37 度の HPS 中で培養した。培養液中に放出された PGE2 濃度を以下の酵素阻害剤、すなわち NS398(COX-2 阻害)または KT109(DAGL-beta 阻害)または D034(DAGL-alpha と beta 阻害)または MJN110(MAGL 阻害)の存在した状態かもしくは存在しない状態で測定した。PGE2 濃度は酵素免疫法キット(Cayman Chemical)を用いて測定した。

さらに遺伝子欠損動物を用いた実験を行うために、マウスの炎症モデルを 2% zymosan 30 μ l の後肢皮下注射により作成し、経時的に発熱症状、脳脊髄における COX-2 の発現を免疫組織化学及びウェスタンブロットで、脳組織の PGE2 は酵素免疫法で測定した。またカナビノイド系酵素(MGL)欠損マウスおよび JZL184(MGL 阻害)を用いて発熱について調べた。

4. 研究成果

(*in vivo* 研究)

CFA を片側に注射した結果、注射 3 時間後より同側に熱性痛覚過敏が惹起され、同程度の痛覚過敏が観察期間中である 10 日後まで持続した。対側足趾およびコントロール群では痛覚過敏は観察されなかった。

CFA の注射により 1 日後から脳脊髄液中の PGE2 濃度の上昇が観察されその後経時的に上昇の程度は低下したが、24 日後においても上昇が見られた。
CFA の注射により脳脊髄の血管内皮細胞内に COX-2、mPGES-1 の発現が観察された。免疫陽性血管内皮細胞は中枢神経系内において部位差なく広く分布していた。
脳及び脊髄において誘導された COX-2 免疫陽性細胞の経時的変化を観察したところ 2 日後に著名に増加しその後漸減したが 24 日後においても増加していた。
さらに CFA 注射により誘導された COX-2 の発現部位をさらにウエスタンブロッティング法で確認したところ、脳の実質ではなく血管であることが明らかになった。

(*ex vivo* 研究)

CFA を投与した群では、脳血管の培養液中に有意に大量の PGE2 が放出されていた。そして培養液に NS398 を加えて COX-2 の活性を阻害した群では、培養液中の PGE2 の放出増加が有意に抑制された。しかし、KT109 を加えて DAGL-beta の活性を阻害しても PGE2 の放出増加には影響はなかった。さらに DAGL-alfa と beta の活性を D034 で阻害してもまた MJN110 を加えて MAGL の活性を阻害しても、CFA 投与により惹起された PGE2 の放出増加は影響を受けなかった。

マウス炎症モデルを用いた実験で、zymosan 投与により、体温が上昇し 6 時間後に最大に達し、これは COX-2 阻害薬により抑制された。また投与 3 時間後に COX-2 が脳表面の血管に誘導されることがウエスタンブロットで確認され、その後徐々に低下した。さらに 3 時間後単離した脳血管から COX-2 依存性の PGE2 放出が *ex vivo* 実験系で確認されたが、脳実質からの放出は少なかった。

カナビノイド系酵素(MGL)欠損動物でも野生型マウスと同様に zymozan 注射による炎症で、発熱が惹起された。JZL184(MGL 阻害)前投与を行っても、発熱は惹起された。

以上のように、中枢神経血管内皮細胞は炎症性痛覚過敏の発症及び持続中の PGE2 の合成増加に、中心的役割を果たすことが明らかとなった。また、炎症性痛覚過敏の発症及び持続に関係する PGE2 の産生に対してカナビノイド類が関与する可能性は低いことが確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 T. Ibuki, Y. Yamazaki, H. Kitagawa, K. Matsumura
2. 発表標題 Is cannabinoid system involved in prostaglandin synthesis during inflammatory hyperalgesia?
3. 学会等名 Neuroscience 2019 Chicago (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北川大夢、伊吹京秀、長瀬幹英、岡村将汰、松村潔
2. 発表標題 単離した脳血管 / くも膜標本による炎症時のプロスタグランジンE2産生機構の解析
3. 学会等名 生理学研究所温熱生理研究会 自然科学研究機構岡崎コンファレンスセンター
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北川大夢、伊吹京秀、松村潔
2. 発表標題 マウスへのzymosan皮下投与による発熱と脳内プロスタグランジンE2産生は脳血管内皮細胞に誘導されるシクロオキシゲナーゼ2による
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会 誌上開催
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiromu Kitagawa, Takae Ibuki, Kiyoshi Matsumura
2. 発表標題 A mouse model that can evaluate fever and hyperalgesia due to peripheral inflammation
3. 学会等名 The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北川大夢、伊吹京秀、松村潔
2. 発表標題 末梢炎症による発熱と痛覚過敏を評価できるマウスモデルの確立
3. 学会等名 温熱生理研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsumura K
2. 発表標題 Thermal influence of nasal high flow therapy on the thermoregulatory center
3. 学会等名 Seminar at Fisher & Pykel Healthcare
4. 発表年 2017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	松村 潔 (Matsumura Kiyoshi) (10157349)	大阪工業大学・工学部・教授 (34406)	

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
---------	---------