

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461476

研究課題名(和文) 線維筋痛症における小胞体ストレスを介した疼痛制御機構の解析

研究課題名(英文) The regulation mechanisms of chronic pain via ER-stress pathway in fibromyalgia

研究代表者

荒谷 聡子 (Satoko, Aratani)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：40387064

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)：線維筋痛症(FM)は全身性の強い慢性疼痛を主訴とする疾患である。発症原因は不明であり、根本的な治療法の確立されていない。我々はFMにおける小胞体ストレス分解、ミトコンドリア機能に注目してきた。本研究では神経特異的シノビオリン欠損マウス、FMの病態モデルマウスを作製また患者よりリンパ球を分離し、これらを用いて個体内での病因・病態解析を目的としている。臨床においてFM様の病態を引き起こすことが示唆されているワクチンを用いてモデルマウスの作製を試みたところ、尾の緊張および運動協調性低下を示すマウスが得られた。またFM様の症状に視床下部の機能が関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Fibromyalgia (FM) is a chronic pain syndrome with unknown etiology. Then the decisive treatments for FM have not been established. We focused on ER stress signals and function of mitochondria in FM. In this study, we attempted to establish the neuron specific synoviolin (SYVN1) deficient mice and an inflammation model mice in the central nerves system (CNS) with HPV vaccine as pathological animal models of FM. Then we analyzed the lesions and pathological mechanisms of FM using these mice and tissues derived from patients with FM. The SYVN1 deficient mice had the morphological abnormality in the CNS. The mouse vaccinated with HPV vaccine showed neurological phenotypes that include low responsiveness of the tail reflex and locomotive mobility. Pathological analyses of these mice revealed the damage to the hypothalamus. These data indicated that these model mice were useful for analyses of FM pathology and the hypothalamus could have important roles for symptoms of FM.

研究分野：分子生物学

キーワード：線維筋痛症 疼痛

## 1. 研究開始当初の背景

線維筋痛症 (FM) は正常と比較して刺激に対する痛みの閾値の低下および通常では痛みとして認識されない刺激に対しても痛みを感じ、加えて痛みが長く持続するという慢性疼痛を主訴とする原因不明の難治性疾患である。働きざかりの 30~40 代で多く発症し、長期間にわたる激しい痛みのため社会性の低下を招き日常生活にも困難をきたす。国内に 200 万人以上の患者がいると推定されていることから、患者本人の日常生活の質の低下だけでなく医療・社会経済の面からも非常に重要な問題であると考えられる。FM は全身の痛みに加えてリウマチの合併および炎症性症状、鬱・倦怠感、筋拘縮といった多岐にわたる症状を伴い古くからリウマチ性疾患として知られていたが、バイオマーカーもなく生化学的な異常も検出されないことから病態・発症メカニズムについては明らかにされていない。最近、抑制性の神経伝達物質 GABA の類似化合物として開発された *tenicamier* が FM の慢性疼痛、筋拘縮に効果を示すことが報告され、FM の治療薬として使用されるようになった。同薬剤は GABA 受容体だけでなく電位依存性カルシウムチャンネルのサブユニット  $\alpha 2\text{-}\delta$  とリガンドである凝固素因子 Thrombospondin 1 (TSP1) の結合を阻害するといわれ、 $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルのシグナルが関与していることが示唆された。さらに FM 患者のリンパ球や脳において呼吸鎖における抗酸化酵素の発現量の低下と活性酸素の増加、ミトコンドリアの分解といったミトコンドリア不全がみられることが明らかになっていた。

一方、当研究室では関節リウマチ (RA) に注目して E3 ユビキチン化酵素シノビオリンの解析を行っており、滑膜細胞増殖を制御する因子として小胞体ストレスに関与するシノビオリンをクローニングした。遺伝子改変動物を用いた解析から、シノビオリンが RA の発症、病態に重要な因子であることを見出した。このことから蓄積した不良タンパク質の分解およびユビキチン化修飾によりシグナル伝達を調節し、小胞体ストレス応答や p53 を介したアポトーシスの抑制により細胞増殖を調節しているというモデルを提唱した (Nat. Clin. Prac. Rheum)。他の研究グループからも、RA および慢性炎症におけるシノビオリンの重要性が示されている。さらに我々はシノビオリンの機能を明らかにするため時期特異的欠損マウスを作製した。同マウスでは遺伝子欠損後体重の減少、白色脂肪組織の萎縮およびミトコンドリアの増加が認められた。シノビオリンは  $\beta$  酸化およびミトコンドリアの活性化に関与する転写因子 PGC-1 $\beta$  を基質とし、ミトコンドリアの制御において重要な役割を果たすことを明らかにした。またシノビオリンと中枢神経での慢性炎症との関連を解析するため神経細胞特異的シノビオリン欠損マウスを作製し、振

戦・歩行障害などの表現型が認められることを発見した。

## 2. 研究の目的

GABA による神経伝達は受容体 A, B を介しており、最近シノビオリンがそのうちの GABA B 受容体をユビキチン化しその発現量を調節していることが報告された (JBC 2013)。また GABAA 受容体もシノビオリンの関与は不明であるがプロテアソームにより分解制御をうけることが知られている。さらに我々は FM における抗疼痛薬が小胞体ストレスを誘導することを見出した。このように FM の病態がシノビオリンの機能と共通する点が多くみられることから、疼痛および筋拘縮といった病態が小胞体ストレスおよびシノビオリンと関与するのではないかと仮説をたてた。さらに FM の病態の 1 つであるミトコンドリア不全は慢性炎症と深く関与し、シノビオリンの低下はミトコンドリアの機能を活性化および抗炎症作用をもつことから、シノビオリン欠損マウスは FM の病態に対して抵抗性を示すのではないかと考えた。本研究では FM 患者検体およびシノビオリン欠損マウスを用いて FM の病態・発症メカニズムとシノビオリンの関与を明らかにし、シノビオリンを標的とした FM の治療法の開発を目指す。

本研究ではシノビオリンおよび小胞体ストレスに着目して、FM の病因・病態メカニズムの解析を行う。当研究機関は国内で最も多くの FM 患者末梢血の細胞バンクを有している。そこで患者検体ももちいて FM と正常細胞での小胞体ストレス、GABA シグナルおよびミトコンドリア関連遺伝子の関与を検討する。また振戦および小胞体ストレスの異常が認められる神経細胞特異的シノビオリン欠損マウスを用いて、ミトコンドリアの機能と FM でみられる病態の関連について個体内で検討する。

## 3. 研究の方法

### I. 神経特異的シノビオリン欠損マウス

マウスの作製  
synuclein プロモーターによる神経特異的 Cre 発現マウスとシノビオリン floxed マウスを交配し神経特異的シノビオリン欠損マウスを作製する。

ノックアウトマウスの病理学的検討  
シノビオリン欠損マウスの振戦が脳や神経、筋肉に形態学的異常によるものかどうか病理学的解析を行った。HE 染色およびクリューバー・バレラ (KB) 染色により細胞の構造や数、小胞体の異常があるかどうか検討する

### II. モデルマウスの作製

疼痛、慢性炎症メカニズム・遷延化に関してプロトタイプと考えられる、子宮頸がんワ

クチン関連神経免疫異常症候群との関連が示唆されている HPV ワクチンを用いた病態モデルマウスを作製し解析を行う。

#### マウスの作製

11 週齢のメスマウスに子宮頸がんワクチンを 2 週間おきに 5 回筋肉に注射する。また中枢神経系での病態を検出しやすくするため百日毒素を腹腔に投与する。

#### 組織学的解析

マウスの脳を採取し切片を作製し病理学的解析を行う。HE 染色および KB 染色により細胞の構造や数、小胞体の異常があるかどうか検討する。さらに免疫組織染色により神経伝達関連因子の発現を検討しシグナル伝達への影響を、TUNEL アッセイによりアポトーシスの有無を検討する。

#### 行動学的解析

認知、運動協調性に影響があるか、筋力低下によるものか、ローターロッドテスト、Horizontal bar test、筋力測定を行う。

### III. 患者検体におけるシグナル伝達系の解析

#### -1 シノビオリンの関与の検討

FM の病態と関与が推測されるシノビオリンの関与を検討する。FM 患者および正常人の PBMC から細胞抽出液および RNA を抽出し、シノビオリンの発現量の差を比較する。さらに治療前後および疼痛以外の主病態ごとに分類された患者検体を用いて、病態とシノビオリンの発現量の変化を検討する。

#### -2 小胞体ストレスの関与

FM 患者および正常人の PBMC を用いて、ユビキチン化および小胞体ストレスマーカー (Bip, CHOP などのタンパク質発現、XBP-1 のスプライシングなど) の発現を調べる。さらに正常人由来の細胞に疼痛薬を添加し小胞体ストレスを活性化するかどうか検討する。

### 4. 研究成果

神経特異的シノビオリン欠損マウスについて、マウスが出生後約 2 週間で致死であるが中枢神経系の解析の病態解析が進んでいる。細胞数の減少、形態学的異常がみられることを明らかにしており、この結果については今後まとめていく予定である。

次にプロトタイプである HPV ワクチンを用いた線維筋痛症様モデルマウスの作製を試みた。ワクチン投与により半数の個体において実験的自己免疫性脳脊髄炎モデルマウスでみられるような尾の緊張低下が認められた。さらに同投与個体には運動能への影響を検討したところ筋力に差は見られなかったが運動協調性の低下が検出された (図 1)。脳の組織切片の HE 染色による組織学的解析により第三脳室の狭小化していることが明らかになった。またリンパ球の浸潤といった顕著な炎症所見は見られなかった。さらにアポトーシスの有無を組織切片の TUNEL

アッセイにより検討したところ、ワクチン投与個体ではコントロールと比較して約 7 倍多くのアポトーシス陽性細胞が検出された。特に視床および視床下部の血管周辺部に散見され、免疫組織染色により血管内皮細胞であることが同定された (図 2)。シグナル伝達への影響を神経伝達物質の組織染色で検討した。視床下部において GABA の減少およびドーパミンシグナル合成に関与する酵素の増加から、GABA およびドーパミン介在ニューロンを含むシグナル伝達系への影響が示唆された。さらに同マウスにおいて小胞体ストレスの影響を検討するためシノビオリンの発現を調べたところ群間での差は見られなかった。線維筋痛症でみられる疼痛、自律神経症候、認知など視床下部の関与が示唆されており、本研究において作製したモデルマウスは上記のような病態の解析の一助となり得ると期待できる。

線維筋痛症患者検体を用いた検討においては、血液より PBMC を単離し関連因子の発現の解析を行っている。患者検体においても抗疼痛薬と小胞体ストレスが関与することを確認した。

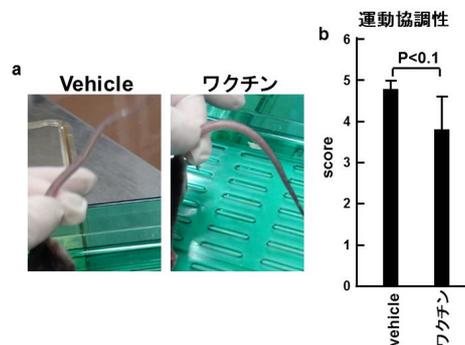


図 1 モデルマウスの病態

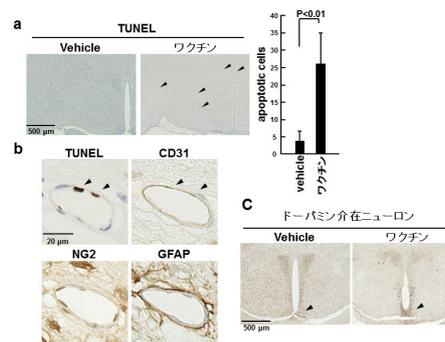


図 2 モデルマウスの組織学的解析

### 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 8 件)

Aratani S, Fujita H, Yagishita N, Yamano Y, Okubo Y, Nishioka K, Nakajima T, Inhibitory effects of ubiquitination of synoviolin by PADI4,

Mol. Med. Rep, 査読有, 2017, in press

Usui C, Soma T, Hatta K, Aratani S, Fujita H, Nishioka K, Machida Y, Kuroiwa Y, Nakajima T, Nishioka K, A Study of Brain Metabolism in Fibromyalgia by Positron Emission Tomography, Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 査読有, 2017, 75:120-127, DOI: 10.1016/j.pnpbp.2017.01.012

Aratani S, Fujita H, Kuroiwa Y, Usui C, Yokota S, Nakamura I, Nishioka K, Nakajima T, Murine hypothalamic destruction with vascular cell apoptosis subsequent to combined administration of human papilloma virus vaccine and pertussis toxin, Sci. Rep., 査読有, 2016, 6: 36943, DOI: 10.1038/srep36943.

Nakajima F, Aratani S, Fujita H, Nakatani K, Makita K, Nakajima T, A case of fibromyalgia involving pain throughout the body treated with site-specific targeted pain control, Springerplus, 査読有, 2016, 5: 1027, DOI: 10.1186/s40064-016-2572-z.

Fujita H, Aratani S, Fujii R, Yamano Y, Yagishita N, Araya N, Izumi T, Azakami K, Hasegawa D, Nishioka K and Nakajima T, Mitochondrial Ubiquitin Ligase Activator of NF- $\kappa$ B (MULAN) regulates NF- $\kappa$ B signaling in ER stress-stimulated cells., 査読有, 2016, 37: 1611-1618, DOI: 10.3892/ijmm.2016.2566

Fujita H, Yagishita N, Aratani S, Saito-Fujita T, Morota S, Yamano Y, Magnus J. Hansson, Inazu M, Kokuba H, Katsuko Sudo K, Sato E, Kawahara K, Nakajima F, Hasegawa D, Higuchi H, Sato T, Araya N, Usui C, Nishioka K, Nakatani Y, Maruyama I, Usui M, Hara N, Uchino H, Eskil Elmer, Nishioka K, Nakajima T, 査読有, 2015, 34:1042-1055, DOI: 10.15252/embj.201489897

Nakajima F, Komoda A, Kawate M, Aratani S, Fujita H, Nakatani K, Akiyama M, Makita K, Nakajima T, Effects of Xenon Irradiation of Stellate Ganglion Region on Fibromyalgia, Journal of Physical Therapy Science, 2015, 査読有, 27: 209-212, 10.1589/jpts.27.209.

Nakajima F, Aratani S, Fujita H, Yagishita N, Ichinose S, Makita K, Setoguchi Y, Nakajima T, Synoviolin inhibitor LS102 reduces endoplasmic reticulum stress-induced collagen synthesis in an in vitro model of stress-related interstitial pneumonia, Int J Mol Med., 2015, 35: 110-116, DOI: 10.3892/ijmm.2014.1984

〔学会発表〕(計 19 件)

荒谷 聡子、藤田英俊、八木下尚子、山野嘉久、西岡久寿樹、中島利博、関節リウマチにおける転写後修飾による多重化シグナル調節機構の解析、第 3 回 JCR ベーシックリサーチカンファレンス、2016 年 10 月 14 日、アキバプラザ (東京、秋葉原)

中島利博、シノビオリンが拓く慢性炎症・関節リウマチの病態メカニズムと新規治療法の開発、第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会、2016 年 10 月 14 日、福岡国際会議場 (福岡)

西森美佐子、山口結花、梅原由加里、中平律子、荒谷 聡子、中島若巳、北川中行、中谷孝、中島利博、線維筋痛症における超音波検査の役割、日本線維筋痛症学会第 8 回学術集会、2016 年 9 月 18 日、KFC ホール (東京、両国)

荒谷 聡子、藤田英俊、黒岩義之、臼井千恵、西岡久寿樹、中島利博、ヒトパピローマウイルスワクチン関連神経免疫異常症候群モデルマウスの解析、日本線維筋痛症学会第 8 回学術集会、2016 年 9 月 17-18 日、KFC ホール (東京、両国)

藤田英俊、荒谷 聡子、西岡久寿樹、中島利博、シノビオリン阻害剤の探索、日本線維筋痛症学会第 8 回学術集会、2016 年 9 月 17-18 日、KFC ホール (東京、両国)

西森美佐子、山口結花、梅原由加里、澁谷美雪、荒谷 聡子、中島若巳、北川中行、中谷孝、中島利博、線維筋痛症における当院の関節超音波検査の取り組みと役割、日本線維筋痛症学会第 8 回学術集会、2016 年 9 月 17-18 日、KFC ホール (東京、両国)

荒谷 聡子、シノビオリン阻害剤の実用化に向けて、第 17 回 運動器科学研究会、2016 年 9 月 3 日、大阪大学中之島センター (大阪、中之島)

Aratani S, Nakajima T, Synoviolin, as a novel factor for understanding obesity and metabolic disorders based on chronic inflammation, International Conference on Obesity and Chronic Diseases, 2016 年 7 月 26 日、Las Vegas (USA)

Aratani S, Fujita H, Yagishita N, Yokota M, Nishioka K, Nakajima T, E3 Ubiquitin ligase synoviolin inhibitors has effects on obesity, International Conference on Obesity and Chronic Diseases, 2016 年 7 月 25 日、Las Vegas (USA)

Nakajima T, Synoviolin, as a new stellar factor for understanding chronic inflammation, MOSCOW INTERNATIONAL FORUM OF BONES AND JOINTS DISORDERS, 2016 年 4

月 19 日、モスクワ (ロシア)

中島若巳、荒谷聡子、藤田 英俊、中谷孝、中島 利博、大腿骨頸部骨折が発症の引き金となった背部痛・咽喉頭部異常感に仙骨硬膜外ブロックが有効であった線維筋痛症の 1 症例、日本線維筋痛症学会第 7 回学術集会、2015 年 10 月 3 日、ベルサール新宿 (東京、新宿)

臼井千恵、西岡健弥、荒谷聡子、藤田英俊、山野嘉久、中島利博、西岡久寿樹、線維筋痛症の心的外傷性ストレスに対する脆弱性: 東日本大震災後 19 ヶ月間の追跡研究、日本線維筋痛症学会第 7 回学術集会、2015 年 10 月 3 日、ベルサール新宿 (東京、新宿)

西森美佐子、尾崎鈴子、藤島みどり、山口結花、梅原由加里、荒谷聡子、中島若巳、中谷孝、中島利博、線維筋痛症における超音波検査の有用性の検討、日本線維筋痛症学会第 7 回学術集会、2015 年 10 月 3 日、ベルサール新宿 (東京、新宿)

荒谷聡子、私達が開発した世界初の E3 ユビキチン化酵素シノビオリン阻害剤 LS シリーズの可能性について、第 16 回 運動器科学研究会、2015 年 9 月 12 日、南日本新聞社 みなみホール (鹿児島)

Nakajima T.、Synoviolin and metabolic disorder、Shanghai-Tokyo Workshop on Rheumatology 2015、2015 年 7 月 31 日、上海 (中国)

荒谷聡子、臼井千恵、藤田英俊、八木下尚子、山野嘉久、西岡健弥、伊藤健司、長田賢一、中村郁朗、西岡久寿樹、中島利博、GABA 構造類似薬の副作用による肥満と小胞体ストレスの関与について、日本線維筋痛症学会第 6 回学術集会、2014 年 9 月 13-14 日、JA 長野ビル (長野)

西森美佐子、尾崎鈴子、藤島みどり、山口結花、梅原由加里、澁谷美雪、荒谷聡子、中島若巳、堤克嘉、上村致信、中谷孝、中島利博、線維筋痛症における重複類縁疾患の超音波画像の検討、日本線維筋痛症学会第 6 回学術集会、2014 年 9 月 13-14 日、JA 長野ビル (長野)

Nakajima T.、aspect of Protein degradation in locomotive syndrome and metabolic disorders、THE 2nd BIO RHEUMATOLOGY INTERNATIONAL CONGRESS、2014 年 6 月 7 日、モスクワ (ロシア)

荒谷聡子、山野嘉久、藤田英俊、八木下尚子、伊藤健司、長田賢一、中村郁朗、西岡久寿樹、中島利博、小胞体ストレスと線維筋痛

症における抗疼痛薬による肥満の関与について、第 58 回日本リウマチ学会学術集会、2014 年 4 月 26 日、グランドプリンスホテル高輪 (東京)

〔図書〕(計 1 件)

Yagishita N, Aratani S, Fujita H, Yamano Y, Nishioka K, Nakajima T.、InTech、New Developments in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis、2017 年、150 ページ (121-135)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
<http://toshinakajima2014.wixsite.com/tokyomed>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

荒谷 聡子 (ARATANI, Satoko)  
東京医科大学・医学部・講師  
研究者番号：40387064

### (2) 研究分担者

中島 利博 (NAKAJIMA, Toshihiro)  
東京医科大学・医学部・教授  
研究者番号：90260752