

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08670

研究課題名(和文) 痛みの感覚的・情動的側面に対するレゾルビン類脳内投与の効果と作用機序の解明

研究課題名(英文) Effects of resolvins and their mechanism of action on the sensory and emotional components of pain

研究代表者

佐藤 公道 (Sato, Masamichi)

京都大学・薬学研究科・名誉教授

研究者番号：80025709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)： $\omega$ -3系脂肪酸の代謝産物であるレゾルビン類の、慢性痛に伴う抑うつ・不安症状に対する効果を検討した。レゾルビン類の側脳室内投与は、LPS誘発うつ病モデルマウスにおいて抗うつ作用を有することを明らかにした。RvD1の抗うつ作用はPI3K-mTOR経路及びMEK/ERK-mTOR経路を介し、RvD2は後者のみを介すること、またRvE1はChemR23-mTOR経路を介することが示唆された。さらに、慢性痛モデルマウスにおいて、RvE1アゴニスト投与が抗うつ作用を示した。このことから、レゾルビン類が痛みにより惹起される抑うつ症状を改善することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of resolvins, metabolites of  $\omega$ -3 fatty acids, on depression and anxiety symptoms associated with chronic pain. The intracerebroventricular administration of resolvin D1 (RvD1), D2 (RvD2), E1 (RvE1), and E2 (RvE2) demonstrated antidepressant effects in LPS-induced depression model mice. It was suggested that antidepressant effect of RvD1 is mediated through PI3K-mTOR pathway and MEK / ERK-mTOR pathway, and that antidepressant action of RvD2 is mediated by MEK / ERK-mTOR pathway. It was also suggested that the antidepressant effect of RvE1 is mediated through the ChemR23-mTOR pathway. Furthermore, in the chronic pain (SNI) model mouse, intracerebroventricular administration of Chemerin, an agonist of RvE1 or ChemR23, showed antidepressant effects. These results suggest that resolvins could improve the depressive symptoms caused by pain.

研究分野：薬理学

キーワード：レゾルビン 痛み 抑うつ 不安 不快情動  $\omega$ -3系脂肪酸

## 1. 研究開始当初の背景

痛みにより惹起される抑うつ、不安などの負情動は、生体警告系としての痛みの生理的役割にとって重要である。しかしながら、痛みが慢性化した場合には、これら負情動は、患者のQOLを著しく低下させるだけでなく、精神疾患・情動障害の引き金ともなり、また、そのような精神状態が痛みをさらに悪化させるという悪循環を生じさせる。このことは、感覚的側面だけでなく情動的側面をも考慮した疼痛治療の必要性を示唆している。現在、痛みの治療には、非ステロイド性抗炎症薬やオピオイド鎮痛薬が使用されているが、治療抵抗性を示すケースや副作用発現の報告も多くなされており、新たな鎮痛薬あるいは鎮痛補助薬の開発が期待されているところである。痛みの感覚的側面だけでなく情動的側面にも着目して、生理活性物質の薬理作用研究を進めることにより、新規な作用機序を有する鎮痛薬・鎮痛補助薬の開発への道が拓かれることが期待される。

近年、多価不飽和脂肪酸とその代謝物の中枢作用が注目を集めており、我々は、 $\omega$ -3系脂肪酸(ドコサヘキサエン酸(DHA)やエイコサペンタエン酸(EPA)など)の代謝産物であり、抗炎症作用を有することが報告されているレゾルビン類に着目した。これまでに、脊髄くも膜下腔内や炎症部位へのレゾルビン類局所投与により感覚神経や脊髄神経において炎症関連分子の発現が抑制されるとともに、痛覚情報伝達に参与するTRPチャネルの機能抑制により、鎮痛作用が得られることが報告されている(Xu et al. Nat.Med. 2010)。一方、脳内におけるレゾルビン類の作用については殆ど検討がなされていないが、 $\omega$ -3系脂肪酸は脳内に豊富に存在することから、レゾルビン類が脳内において機能している可能性は高い。

## 2. 研究の目的

本研究は、 $\omega$ -3系脂肪酸の代謝産物である抗炎症性物質レゾルビン類に着目し、痛みの感覚的・情動的側面に対するレゾルビン類脳内投与の効果を検討し、作用機序を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) リポポリサッカライド(LPS)誘発うつ病モデル

LPSを腹腔内に投与した2-6時間後までは発熱や自発運動量の低下などのsickness behaviorが認められるが、これらは投与24時間後までに回復する。一方で、尾懸垂試験や強制水泳試験での無動時間延長、スクロース嗜好性低下(anhedonia)などの抑うつ様行動が認められるようになることが報告されている。本実験では、雄性BALB/cマウス(11-12週齢)にLPS(0.8 mg/kg)またはsalineを腹腔内投与し、24時間後

に行動薬理試験を行った。

### (2) 神経障害性疼痛モデル

神経障害性疼痛モデルとしてspared nerve injury(SNI)モデルを用いた。雄性BALB/cマウス6週齢(SNIモデル作製時)の坐骨神経に由来する総腓骨神経、脛骨神経を結紮し、末梢側を切断することで作製した。なお、神経の露出までを行った群(sham群)をコントロールとした。SNI手術実施日をday0として、その1日前に疼痛評価を行い、その後は術後2週間にわたって1週間ごとに疼痛評価を行った。SNI手術から14日後に側脳室内投与を行い、その2時間後に尾懸垂試験をし、その後疼痛評価を行った。

### (3) von Frey test

マウスの足の裏に太さの異なるフィラメントを用いて圧力を加え、逃避行動を観測することによって疼痛評価を行った。低圧力のフィラメントから順に刺激を行い、50%疼痛閾値を求めた。値が低いほど疼痛が強く発現していることを示している。

### (4) 側脳室内投与

麻酔下で、bregmaより尾側方向に0.3 mm、外側方向に1.0 mmの位置へガイドカニューレを埋め込み、5日以上回復期間の後、側脳室内投与、行動試験を行った。側脳室内投与は、インジェクションカニューレを用いて、頭蓋表面から深さ3.0 mmの側脳室内に流速2.5  $\mu$ l/minで5  $\mu$ l投与した。

### (5) 脳内局所投与

麻酔下で、ガイドカニューレをmPFC(AP: +1.8 mm, LM:  $\pm$ 0.4 mm, DV: -2.5 mm)、海馬歯状回(AP: -1.7 mm, LM:  $\pm$ 1.1 mm, DV: -0.5 mm)に埋め込んだ。5日以上回復期間の後、局所投与、行動試験を行った。局所投与は、インジェクションカニューレを用いて、頭蓋表面からそれぞれ深さ2.8 mm、2.0 mmに流速0.125  $\mu$ l/minで0.25  $\mu$ l、0.15  $\mu$ l/minで0.15  $\mu$ l投与した。

### (6) 尾懸垂試験(Tail suspension test, TST)

マウスの尾を試験装置天井に設置したフックに粘着テープで固定してマウスを逆さの状態に吊り、6分間の試験中にマウスが動かなかった時間(無動時間)を自動解析装置により測定した。無動時間が長いほど抑うつ傾向が強いことを示している。

## 4. 研究成果

### (1) LPSモデルにおけるレゾルビンD

(RvD) の抗うつ作用  
尾懸垂試験を用いて、RvD1 および RvD2 の側脳室内投与が、LPS 誘発うつ様行動に与える影響を検討した。LPS 投与の 22 時間後に RvD1 および RvD2 を側脳室内に投与し、その 2 時間後に尾懸垂試験を行ったところ、RvD1 および RvD2 はいずれも LPS による無動時間延長を有意に抑制し、抗うつ作用を有することが示唆された (図 1)。RvD1 の抗うつ作用は LY294002、U0126、rapamycin の前処置により阻害されたことから、PI3K-mTOR 経路及び MEK/ERK-mTOR 経路を介することが示唆された。一方 RvD2 の抗うつ作用は U0126、rapamycin の前処置により阻害されたことから、MEK/ERK-mTOR 経路を介することが示唆された。また、抗うつ作用の発現に関わる脳領域を探索するため、RvD1 および RvD2 を内側前頭前皮質 (mPFC)、海馬歯状回内に局所投与し、その 2 時間後に尾懸垂試験を行ったところ、LPS による無動時間延長が有意に抑制された。このことから、RvD1、RvD2 ともに mPFC および海馬歯状回を介して抗うつ作用を示すことが示唆された。

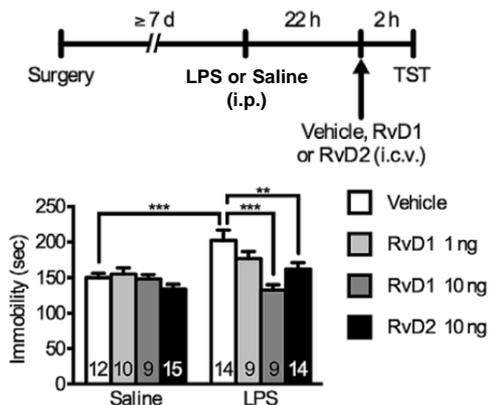


図 1 LPS モデルにおけるレゾルビン D の抗うつ作用

(2) LPS モデルにおけるレゾルビン E (RvE) の抗うつ作用

尾懸垂試験を用いて、RvE1 および RvE2 の側脳室内投与が、LPS 誘発うつ様行動に与える影響を検討した。LPS 投与の 22 時間後に RvE1 および RvE2 を側脳室内に投与し、その 2 時間後に尾懸垂試験を行ったところ、RvE1 および RvE2 はいずれも LPS による無動時間延長を有意に抑制し、抗うつ作用を有することが示唆された (図 2)。RvE1 および RvE2 は ChemR23 に対してそれぞれアゴニスト、部分アゴニストとして、BLT1 に対してアンタゴニストとして作用することが報告されている。そこで、ChemR23 アゴニスト chemerin および BLT1 アンタゴニスト U75302 の抗うつ作用を検証したところ、chemerin の側脳室内投与

により無動時間延長が用量依存的に抑制された。また、mTORC1 阻害剤である rapamycin の前処置は、RvE1 の側脳室内投与による無動時間減少を抑制した。このことから、RvE1 の抗うつ作用は ChemR23-mTOR 経路を介することが示唆された。

また、抗うつ作用の発現に関わる脳領域を探索するため、RvE1 を mPFC、海馬歯状回内に局所投与し、その 2 時間後に尾懸垂試験を行ったところ、LPS による無動時間延長が有意に抑制された。このことから、RvE1 が mPFC および海馬歯状回を介して抗うつ作用を示すことが示唆された。

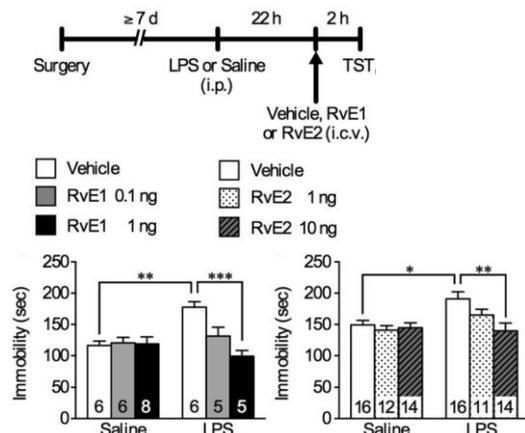


図 2 LPS モデルにおけるレゾルビン E の抗うつ作用

(3) 神経障害性疼痛モデルにおける RvE の抗うつ作用

SNI 手術後に von Frey test により疼痛閾値を計測した。SNI 群は sham 群に比べて疼痛閾値が有意に低下していた。RvE1 の側脳室内投与は疼痛閾値に影響を与えなかった。SNI 手術によりうつ様行動が惹起されるかを検討するため、手術 2 週間後に TST 試験をおこなった。SNI 手術群では sham 群と比較して有意な無動時間の延長が認められた。RvE1 あるいは chemerin の側脳室内投与は無動時間を減少させる作用を示した。このことから、レゾルビン類が痛みにより惹起される抑うつ症状を改善することが示唆された。

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 3 件)

- ① Deyama S, Ishikawa Y, Yoshikawa K, Shimoda K, Ide S, Satoh M, Minami M. Resolvin D1 and D2 reverse lipopolysaccharide-induced depression-like behaviors through the

mTORC1 signaling pathway.  
Int. J. Neuropsychopharmacol., 査読有、  
2017; 20(7): 575-584.  
<https://academic.oup.com/ijnp/article/20/7/575/3610563>  
doi: 10.1093/ijnp/pyx023.

- ② Ishikawa Y, Deyama S, Shimoda K, Yoshikawa K, Ide S, Satoh M, Minami M.  
Rapid and sustained antidepressant effects of resolvin D1 and D2 in a chronic unpredictable stress model. Behav. Brain Res., 査読有、2017; 332: 233-236.  
[https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166-4328\(17\)30653-8](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166-4328(17)30653-8)  
doi: 10.1016/j.bbr.2017.06.010.
- ③ Deyama S, Shimoda K, Suzuki H, Ishikawa Y, Ishimura K, Fukuda H, Hitora-Imamura N, Ide S, Satoh M, Kaneda K, Shuto S, Minami M.  
Resolvin E1/E2 ameliorate lipopolysaccharide-induced depression-like behaviors via ChemR23. Psychopharmacology (Berl), 査読有、2018; 235(1): 329-336.  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00213-017-4774-7>  
doi: 10.1007/s00213-017-4774-7.

〔学会発表〕(計 2 件)

- ① 石川由香、出山諭司、吉川琴美、霜田健斗、井手聡一郎、人羅(今村)菜津子、佐藤公道、南雅文  
レゾルビン D1、D2 の抗うつ作用メカニズムの解明  
第 38 回日本生物学的精神医学会、第 59 回日本神経化学学会大会  
平成 28 年 9 月 9 日、福岡
- ② 鈴木 博恵、出山 諭司、霜田 健斗、石川 由香、石村 航平、福田 隼、人羅(今村)菜津子、井手 聡一郎、佐藤 公道、金田 勝幸、周東 智、南 雅文  
レゾルビン E1 およびレゾルビン E2 の抗うつ作用機序  
日本薬学会 第 138 年会  
平成 30 年 3 月 26 日、金沢

〔図書〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 公道 SATOH Masamichi  
京都大学, 薬学研究科, 名誉教授  
研究者番号 80025709

(2)研究分担者

井手 聡一郎 IDE Soichiro  
公益財団法人東京都医学総合研究所, 精神行動医学研究分野, 主席研究員  
研究者番号 30389118

人羅 菜津子 HITORA Natsuko  
北海道大学, 薬学研究院, 助教  
研究者番号 40762191