

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10566

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛の発症機構における脂肪酸-GPR40/FFAR1 シグナルの関与

研究課題名(英文) Involvement of fatty acid-GPR40/FFAR1 signaling in the development of neuropathic pain

研究代表者

中本 賀寿夫 (Nakamoto, Kazuo)

神戸学院大学・薬学部・講師

研究者番号：30432636

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、内因性の疼痛制御機構の調節における脳内の脂肪酸 GPR40/FFAR1 シグナルの役割を解明することである。GPR40/FFAR1 シグナルを薬理的または遺伝子工学的により抑制したマウスに対して、術後痛を負荷すると、対照マウスと比して痛みが持続し、慢性化することが明らかとなった。さらに、術後痛の急性期の視床下部や中脳において、数種類の遊離脂肪酸含量が増加することも示した。

以上、脳内の n-3 系脂肪酸 GPR40/FFAR1 を介した機構は、痛みの調節において重要なシグナルであり、急性痛から慢性疼痛へと移行する過程にこれらシグナルの低下が関与している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we provided that brain free fatty acids-GPR40/FFAR1 signaling is an important factor in the regulation of endogenous pain control system. We found that a GPR40/FFAR1 antagonist or its deficient mice induced exacerbation of postoperative pain after paw incision. Furthermore, some free fatty acids including docosahexaenoic acid increased in the brain of an earlier phase of postoperative pain state. Finally, our findings suggested that, in the pain state, GPR40/FFAR1 signaling may play a key role in the modulation of the endogenous pain control system and that GPR40/FFAR1 signaling could be an important factor facilitating recovery of pain. Finally, modulation of these signaling may be involved in the transition from acute to chronic pain.

研究分野：中枢薬理学

キーワード：疼痛 脂肪酸受容体GPR40/FFAR1 脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

(1) これまでに我々はドコサヘキサエン酸(DHA)が種々の異なる疼痛試験において、用量依存的な抗侵害(鎮痛)作用を示すこと(*Biol. Pharm. Bull.*, 2010)、その抗侵害作用発現機序の一因には、内因性のオピオイドペプチドの一つであるβ-エンドルフィン(内因性の鎮痛用物質)の遊離を介した間接的作用であること等を明らかにしている(*Eur. J. Pharmacol.*, 2011)。したがって、DHAなどの種々の脂肪酸が生体内の疼痛制御機構において重要な役割を果たす可能性を提唱している。

(2) 近年、脂肪酸に関する様々な研究報告が蓄積してきた結果、脂肪酸は単なる栄養素に留まらず、シグナル伝達分子として重要な役割を果たしていることがわかってきた。事実、各種脂肪酸がそれぞれ特異的にG蛋白共役型7回膜貫通型の**新規膜型脂肪酸受容体**(GPR40/FFAR1など)を活性化し、種々の生理作用を発揮することが報告されている(*Nature*, 2003)。なかでも、DHAのような多価不飽和脂肪酸はGPR40/FFAR1のリガンドであることが報告され(*JBC*, 2003)、これらの受容体を介した脂肪酸シグナルは、末梢領域においてインスリンなどのホルモン分泌の調節を介して糖・脂質代謝の恒常性維持に関与していることから、糖尿病治療薬の標的分子として注目されている。

一方、中枢神経系領域においては、これら受容体は広範囲に渡って発現していることが知られている。それにもかかわらず、生理的な意義やその役割はほとんどわかっていない。最近、著者らはGPR40/FFAR1のアゴニストGW9508の脳室内投与により抗侵害作用を示すことや視床下部、特に弓状核領域においてβ-エンドルフィンの発現が増加することを見いだした。DHAによる抗侵害作用の

発現には脳内GPR40/FFAR1を介したβ-エンドルフィンの遊離が関与していることを示した(*Brain Res.*, 2012)。

さらに最近、脳内脂肪酸-GPR40/FFAR1を介したシグナル機構に対する下行性疼痛制御機構の関与を中心に検討を行い、GPR40/FFAR1がプロオピオメラノコルチン(POMC)神経、セロトニン(5-HT)およびノルアドレナリン作動性神経上に発現していることを明らかにした。さらに、GPR40/FFAR1アゴニストGW9508やDHAは下行性疼痛制御機構に関連する神経を直接または間接的に活性化させ、ホルマリン誘発疼痛や完全フロインドアジュバンド(CFA)誘発炎症性疼痛に対して抗侵害作用を示すことを報告した。これらの結果は脳内の脂肪酸-GPR40/FFAR1を介したシグナル機構が、下行性疼痛抑制機構の活性化および調節を担っている可能性を示している(*Br. J. Pharmacol.*, 2015)。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、疼痛時における脳内脂肪酸-GPR40/FFAR1シグナル機構の役割について、GPR40/FFAR1ノックアウトマウスを用いて明らかにする。最終的にはGPR40/FFAR1シグナル機構の活性化が新たな疼痛制御機構となることを証明し、疼痛のための創薬ターゲットになりうることを提唱することを目的とする。具体的には、以下の2つの点について明らかにする。

1. 神経障害性疼痛、炎症性疼痛や術後痛モデルマウスを作製し、GPR40/FFAR1の蛋白質発現変化および脳内のリポドミクス解析を行い、脂肪酸-GPR40/FFAR1シグナル機構の機能的意義を明らかにする。

(2) GPR40/FFAR1欠損による疼痛発現の変容に関して解析を行い、脂肪酸-GPR40/FFAR1シグナル機構の破綻が、神経障害性疼痛の病態形成やその後の慢性化に

関与していることを証明する。

3. 研究の方法

(1). 動物

7 週齢の ddY 系雄性および 5 週齢の C57BL/6J 系雄性マウスを使用した。また、GPR40/FFAR1 欠損マウスは、京都大学 平澤明准教授より分与して頂いた。

(2). 試薬ならびに投与方法

GW1100 (GPR40/FFAR1 アンタゴニスト) は 10 μ g/mouse の用量で脳室内 (i.c.v.) 1 日 1 回 5 日間反復投与を行った。naloxone は 1 μ g/mouse の用量で i.p. 投与を行った。i.c.v. 投与は Heley and McCormic の方法に従って行った。

(3). 術後痛モデルマウスの作製

Brennan らの方法を用いて作製した。麻酔下、マウスの右側後肢足底部を、メスを用いて足裏の皮膚と筋膜をかかとからつま先に向け 5mm 切開した。次に、先曲ピンセットを用いて筋肉を 10 回持ち上げ、メスで縦方向に 5 回筋肉を断裂しないように切開した。切開後、筋肉を元の位置に戻し、6-0 ナイロンで縫合した。偽手術群 (sham 群) は、右側後肢足底部に 10% ポピドンヨードによる消毒のみ行い作製した。

(4). von Frey 試験 (vF)

機械的刺激に対する逃避反応の評価は vF 試験を用いた。von Frey filament は 0.16 g と 0.4 g を使用した。マウスの後肢腹側中心部に、filament を少し曲がるまで垂直に押し当て、6 秒間刺激し逃避反応を観察した。この操作を 10 回繰り返し、逃避反応を示した回数を記録した。フィラメントに対する反応回数増加を機械的刺激に対する過敏性ありとして評価した。

(5). 脳組織抽出液の調製および Real time PCR 用サンプルの調製

RNeasy Mini kit を用いて RNA を抽出し、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser を

用いて cDNA を調製した。

(6). Real time PCR 法

FastStart Essential DNA Green Master を用いて SYBERGREEN 法にて行った。

(7). 免疫組織染色

蛍光二重免疫組織染色は、常法のプロトコールに従って行った。

(8). 遊離脂肪酸測定

LC-MS/MS にて測定した。

(9). 統計学的処理

一元配置分散解析または二元配置分散解析を行った後に、Tukey test または Bonferroni を用いて統計的解析を行った。2 群間の比較は Student's *t*-test を用いた。全ての結果は、平均 \pm 標準誤差として表した。有意差は、危険率 5% を基準とした。

4. 研究成果

(1) 術後痛時における脳内脂肪酸

—GPR40/FFAR1 シグナル機構の関与

術後痛モデルマウスは、術後 1 日目から機械的刺激に対して過敏反応が認められ、これは 2 日目をピークとして 3 日間持続した。術後 4 日目の痛み閾値は sham レベルまで改善した。このモデルマウスに対して、GPR40/FFAR1 アゴニストの GW1100 を 5 日間反復脳室内投与すると、上記で認められた機械的過敏反応は 6 日目まで増強し、7 日目には消失した。

これらの条件下、術後 2 日目の視床下部では、ドコサヘキサエン酸 (C22:6)、オレイン酸 (C18:1) およびパルミチン酸 (C16:0) 含量が、sham 群と比較して有意に増加した。しかし、アラキドン酸 (C20:4) およびステアリン酸 (C18:0) は sham 群と何ら変化は認められなかった。また術後 1 および 4 日目にはこれら遊離脂肪酸の変動は sham 群と同程度であった。したがって、術後痛の早期の段階において、視床下部の遊離脂肪酸含量が増加することが明らかとなった。以上の

結果から、脂肪酸—GPR40/FFAR1 シグナルの活性化が、内因性の疼痛制御を担う重要な機構であることが示唆された。

(2) 痛みの慢性化機構における脳内脂肪酸-GPR40/FFAR1 シグナルの役割

ワイルドタイプ (WT) マウスを用いて作製した術後痛モデルマウスは、術後 1 日目から機械的刺激に対する過敏反応が認められ、術後 4 日目には回復していた。一方、GPR40/FFAR1 欠損 (GPR40/FFAR1) マウスは、WT と比較して術後 4 日目以降も機械的刺激に対して過敏を示し、この現象は 7 日間以上続き 14 日目には回復した。これらの結果は、GPR40/FFAR1KO によって内因性の疼痛制御機構の機能低下または破綻が生じていることが示唆された。

(3) 疼痛モデルマウスを用いて、疼痛時における脳内の遊離脂肪酸の挙動に変化を与える脂質関連因子の解析を行った。術後 2 日目の視床下部において、ドコサヘキサエン酸およびオレイン酸の増加が術後痛モデルマウスで認められた。アストロサイトに主に発現している脂肪酸結合蛋白質 FABP7 mRNA の発現は、コントロールマウスと比較して術後痛マウスで有意に低下した。一方、リン脂質を加水分解し遊離脂肪酸を産生する酵素のホスホリパーゼ A2 (PLA2) は、術後痛モデルマウスにおいて、iPLA2 mRNA の発現が有意に増加した。以上より、疼痛時における脳内の DHA を含む遊離脂肪酸の変化は、iPLA2 の発現増加および FABP7 mRNA の発現低下が関与していることが示唆された。

本研究は脳内の脂肪酸-GPR40/FFAR1 シグナル機構は内因性の疼痛制御機構の調節を担う重要なシグナルである可能性を提唱した。さらに著者らは、術後痛の急性期の脳において、ドコサヘキサエン酸を含む数種類の遊離脂肪酸含量が増加することを見出した。さらに、GPR40/FFAR1 遺伝子欠損マウ

スへ術後痛を負荷すると、痛みが慢性化することも明らかにした。以上の結果から、脳内の n-3 系脂肪酸-GPR40/FFAR1 を介した機構が、急性痛から慢性疼痛へと移行する過程において重要なシグナルであることを提唱した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. **Nakamoto K**, Aizawa F, Miyagi K, Yamashita T, Mankura M, Koyama Y, Kasuya F, Hirasawa A, Kurihara T, Miyata A, Tokuyama S. Dysfunctional GPR40/FFAR1 signaling exacerbates pain behavior in mice. *PLoS One*. 2017;12(7):e0180610.
2. Aizawa F, Ogaki Y, Kyoya N, **Nakamoto K**, Kurihara T, Hirasawa A, Miyata A, Tokuyama S, The deletion of GPR40/FFAR1 signaling damages maternal care and emotional function in female mice, *Biol Pharm Bull*. 2017;40(8):1255-1259.
3. Aizawa F, Nishinaka T, Yamashita T, **Nakamoto K**, Kurihara T, Hirasawa A, Kasuya F, Miyata A, Tokuyama S, GPR40/FFAR1 deficient mice increase noradrenaline levels in the brain and exhibit abnormal behavior. *Journal of Pharmacological Sciences*. *J Pharmacol Sci*. 2016;132(4):249-254.
4. Aizawa F, Nishinaka T, Yamashita T, **Nakamoto K**, Koyama Y, Kasuya F, Tokuyama S. Astrocytes Release Polyunsaturated Fatty Acids by Lipopolysaccharide Stimuli. *Biol Pharm Bull*. 2016;39(7):1100-6.
5. **Nakamoto K**, Aizawa F, Nishinaka T, Tokuyama S. Regulation of prohormone convertase 2 protein expression via

GPR40/FFAR1/FFA1 in the hypothalamus.

Eur J Pharmacol. 2015;762:459-463.

6. Nakamoto K, Tokuyama S. The role of brain n-3 fatty acids-GPR40/FFAR1 signaling in pain. *Nihon Yakurigaku Zasshi.* 2018;151(1):21-26.
7. 中本賀寿夫, 脳内長鎖脂肪酸受容体 GPR40/FFAR1 を介した新たな疼痛制御機構の可能性、*薬学雑誌総説* 2017;137(2):199-204.
8. 中本賀寿夫、徳山尚吾、脳内長鎖脂肪酸受容体 GPR40/FFAR1 を介した新たな疼痛制御機構の可能性、*日本薬理学雑誌 総説* 2015;146(6):302-8.

〔学会発表〕(計 21 件)

1. 橘 男, 中村 有香, 相澤 風花, 山下 琢矢, 中本 賀寿夫, 糟谷 史代, 徳山 尚吾, 疼痛時の脳内遊離脂肪酸変化に対する脂質関連因子の影響, *日本薬学会第 138 年会*, 2018 年 3 月 26-28 日, 金沢
2. 水沼亮太, 栗原崇, 神戸悠輝, 平澤明, 中本賀寿夫, 大吉達樹, 徳山尚吾, 有田和徳, 宮田篤郎, FFAR1/GPR40/FFAR1 は疼痛遷延化に伴う情動行動変化に関与する, *第 138 回日本薬理学会関東部会*, 2018 年 3 月 10 日, 東京
3. 中本賀寿夫, 相澤風花, 徳山尚吾, 疼痛および情動の調節因子としての脳内長鎖脂肪酸受容体 GPR40/FFAR1 の役割, *痛み研究会 2017*
4. 中本賀寿夫, 相澤風花, 山下琢矢, 平澤明, 栗原 崇, 糟谷史代, 宮田篤郎, 徳山尚吾, 長鎖脂肪酸受容体 GPR40/FFAR1 の抑制は術後痛を悪化させる, *第 70 回日本薬理学会西南部会*, 2017 年 11 月 18 日, 鹿児島
5. Kazuo Nakamoto, Fuka Aizawa, Shogo Tokuyama Free fatty acid receptor hypothalamic GPR40/FFAR1 regulate β -endorphin release via prohormone convertase 2 protein expression, *INRC2017*, July 9-14, 2017 (Chicago, USA)
6. 中本賀寿夫, 相澤風花, 山下琢矢, 平澤明, 栗原 崇, 糟谷史代, 宮田篤郎, 徳山尚吾, 疼痛時における脳内遊離脂肪酸の変化, *第 38 回日本疼痛学会*, 2017 年 6 月 16-17 日, 神戸
7. Kazuo Nakamoto and Shogo Tokuyama, A novel pain control system via brain GPR40/FFAR1 signaling, *AsCNP 2017.4.27-29*, Bali, Indonesia (シンポジウム)
8. 相澤 風花、中本 賀寿夫、徳山 尚吾, 脳内長鎖脂肪酸受容体 GPR40/FFAR1 の活性化が精神疾患による痛みの遅延を抑制する, *日本薬学会 年会 2017 年 3 月 24-27 日*, 仙台
9. 中本賀寿夫, 徳山尚吾, 疼痛時における n-3 系脂肪酸-GPR40/FFAR1 シグナリングの役割, *第 90 回日本薬理学会 年会 2017 年 3 月 15-17 日*, 長崎
10. 中本賀寿夫, 相澤風花, 山下琢矢, 万倉三正, 小山豊, 糟谷史代, 平澤明, 栗原崇, 宮田篤郎, 徳山尚吾, 長鎖脂肪酸受容体 GPR40/FFAR1 の欠損は痛みの増強に関与する, *JNRC2016*, 2016 年 8 月 19-20 日 (北海道大学薬学部)
11. Kazuo Nakamoto, Fuka Aizawa, Takuya Yamashita, Akira Hirasawa, Takashi Kurihara, Mitsumasa Mankura, Atsuro Miyata, Yutaka Koyama, Fumiyo Kasuya, Shogo Tokuyama, Inhibition of brain free fatty acid receptor GPR40/FFAR1 signaling exacerbates pain behavior, *INRC2016*, Bath, England. July 10-16, 2016
12. 中本賀寿夫, 京谷奈月, 相澤風花, 西中崇, 山下琢矢, 万倉三正, 小山豊, 糟谷史代, 平澤明, 栗原崇, 宮田篤郎, 徳山尚吾, 長鎖脂肪酸受容体 GPR40/FFAR1 の

- 欠損は痛みを増強する、2016年7月2-3日 第46回日本神経精神薬理学会、2016年7月2-3日 第46回日本神経精神薬理学会 (ソウル)
13. 中本賀寿夫, 西中崇, 相澤風花, 山下琢矢, 万倉三正, 小山豊, 糟谷史代, 徳山尚吾, 術後痛時における脳内遊離脂肪酸の動態, 日本薬学会 136 年会, 2016 年 3 月 27-29 日, 横浜
 14. 炎症時におけるアストロサイトを介した脳内遊離脂肪酸制御機構の解明, 日本薬学会 136 年会, 2016 年 3 月 27-29 日, 横浜
 15. 中本賀寿夫, 相澤風花, 西中崇, 山下琢矢, 万倉三正, 小山豊, 糟谷史代, 徳山尚吾, 慢性疼痛の形成過程における視床下部 GPR40/FFAR1 シグナルの関与, 第 89 回日本薬理学会年会, 2016 年 3 月 9-11 日, 横浜
 16. 中本賀寿夫, 西中崇, 相澤風花, 山下琢矢, 万倉三正, 小山豊, 糟谷史代, 徳山尚吾, 慢性疼痛の形成過程における GPR40/FFAR1/FFA1 シグナルの関与, 日本薬学会近畿支部総会・大会, 2015 年 10 月 17 日, 大阪
 17. 中本賀寿夫, 西中崇, 相澤風花, 山下琢矢, 万倉三正, 小山豊, 糟谷史代, 徳山尚吾, 急性痛から慢性痛へのスイッチ機構としての長鎖脂肪酸—GPR40/FFAR1/FFA1 シグナルの関与, 第 35 回鎮痛薬・オピオイドペプチド研究会 2015, 2015 年 10 月 16-17 日, 和歌山
 18. 中本賀寿夫, 山下琢矢, 糟谷史代, 徳山尚吾, 慢性疼痛の形成過程における脳内長鎖脂肪酸受容体 GPR40/FFAR1/FFA1 シグナルの関与, 第 45 回日本神経精神薬理学会第 37 回日本生物学的精神医学会合同年会, 2015 年 9 月 24-26 日, 東京
 19. 中本賀寿夫, 徳山尚吾, GPR40/FFAR1/FFA1 シグナルを介した新

規疼痛制御機構の解明、生体機能と創薬シンポジウム 2015, 2015 年 8 月 27-28 日, 東京

20. 中本賀寿夫, 西中崇, 相澤風花, 山下琢矢, 糟谷史代, 徳山尚吾, 慢性疼痛時における脳内長鎖脂肪酸 GPR40/FFAR1/FFA1 シグナルの関与, 生体機能と創薬シンポジウム 2015, 2015 年 8 月 27-28 日, 東京
21. Kazuo Nakamoto, Naoya Sato, Takashi Nishinaka, Aizawa Fuka, Mitsumasa Mankura, Yutaka Koyama, Fumiyo Kasuya and Shogo Tokuyama, The involvement of free fatty acid receptor GPR40/FFAR1/FFA1 signaling on the development of chronic pain, INRC2015, June 15-19, 2015, Arizona

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中本 賀寿夫 (NAKAMOTO Kazuo)
神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究室
研究者番号: 30432636

(2) 研究分担者

徳山 尚吾 (TOKUYAMA Shogo)
神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究室
研究者番号: 70225358

糟谷 史代 (KASUYA Fumiyo)
神戸学院大学 薬学部 毒性学研究室
研究者番号: 80131522