

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：33905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07399

研究課題名(和文) 痛覚系において脂肪酸はシグナル分子としての役割を持つか

研究課題名(英文) The role of fatty acids in pain modulation.

研究代表者

小崎 康子 (Kozaki, Yasuko)

金城学院大学・薬学部・教授

研究者番号：20126882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：SHRSP5/Dmcrラットに高脂肪・高コレステロール食(HFC)を摂取させると、摂取開始2～3日後から痛覚過敏が観察される。HFC10,14,24日摂取群の血清中脂肪酸含量を通常食群と比べると、16:0と18:1の有意な増加、20:4n-6と22:6n-3(DHA)の有意な低下が検出された( $p<0.05$  by t-test)。中でもDHAは疼痛抑制作用を持つことが報告されており、DHAに対する親和性が高い長鎖脂肪酸受容体Ffar1が、血液脳関門を欠く視床下部・延髄にも発現していることから、血中の脂肪酸が痛覚修飾機構においてシグナル分子としての役割を果たす可能性が高いと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、エネルギー源として摂取した脂質が、血中脂肪酸含量の変化をもたらし、痛覚の修飾に関与することを明らかにしたものである。下行性疼痛抑制系に深くかかわる視床下部・延髄は、血液脳関門を欠いており、Ffar1等の脂肪酸受容体が発現していることから、血中の脂肪酸がシグナル伝達物質として、細胞膜上受容体を介して痛み感覚の修飾に関与すると考えられる。本成果は、栄養管理に基づく予防医療や脂肪酸受容体を標的とした鎮痛薬の開発の一助となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The intake of a high-fat-cholesterol diet (HFC) causes hyperalgesia from 2-3 days after the start in SHRSP5/Dmcr rats. When serum fatty acid content in the 10, 14, and 24-day HFC groups were compared to the normal diet groups, significant increases in levels of 16:0 and 18:1 and significant decrease in levels of 20:4n-6 and 22:6n-3 (DHA) were detected ( $p<0.05$  by Student's t-test). Among them, DHA has been reported to have an antinociceptive action. The long-chain fatty acid receptor Ffar1, which has a high affinity for DHA, is expressed in the hypothalamus and medulla oblongata lacking the blood-brain barrier. When considering these points, it can be said that fatty acids in the blood may play a role as a signal molecule in the pain modification mechanism.

研究分野：医歯薬学

キーワード：痛覚過敏 高脂肪食摂取 脂肪酸 ドコサヘキサエン酸(DHA) Ffar1

## 1. 研究開始当初の背景

オーファン G タンパク質共役受容体のリガンド検索により、複数の遊離脂肪酸受容体の存在が明らかとなった(表 1)。長鎖脂肪酸受容体 Ffar1 については、下行性疼痛抑制系(中本ら、2015)や疼痛モデル動物における鎮痛(栗原、2015)に関与する可能性が報告されている。さらに、DHA が脳内で脂肪酸受容体 Ffar1 を介して  $\mu$ -エンドルフィンを放出させ、疼痛を抑制することを示唆する報告(西中ら、2013)や血液中(n-6)/(n-3)比が膝痛のレベルと関連するという臨床報告(Sibille ら、2018)もある。脂肪酸のシグナル分子としての役割が注目されるようになってきた。

表 1 同定されている遊離脂肪酸受容体

受容体	リガンド	発現部位
Ffar1(GPR40)	長鎖脂肪酸	膵臓、細胞、腸管、脳、脊髄、脊髄後根神経節
Ffar2(GPR43)	短鎖脂肪酸	脂肪組織、腸管、白血球
Ffar3(GPR41)	短鎖脂肪酸	脂肪組織、腸管、交感神経節
Ffar4(GPR120)	長鎖脂肪酸	脂肪組織、腸管
GPR84	中鎖脂肪酸	脂肪組織、白血球

## 2. 研究の目的

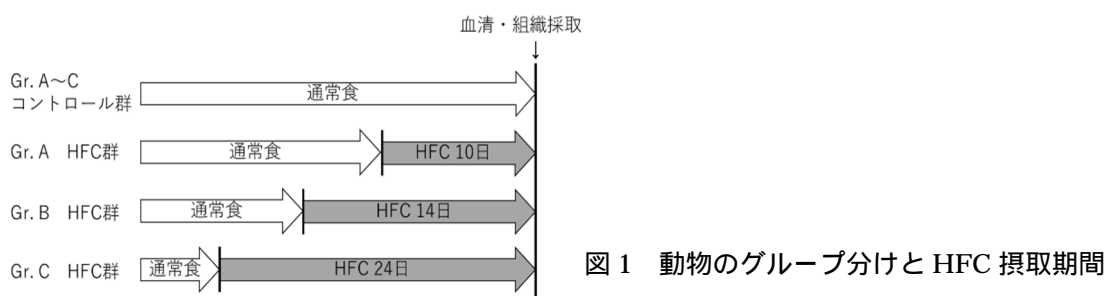
本研究は、エネルギー源として位置づけられている脂肪酸について、痛覚系におけるシグナル分子という観点からその役割に注目したものである。

SHRSP5/Dmcr ラットに高脂肪・高コレステロール食(HFC)を摂取させると、摂取開始 2~3 日後から痛覚過敏が観察される。脂質を添加した HFC が血中脂肪酸含量・組成を変化させ、痛覚過敏を引き起こした可能性がある。

本研究では、HFC 摂取による血中脂肪酸含量・組成の変化を調べ、同時に血液脳関門を欠く視床下部・延髄における脂肪酸受容体遺伝子の発現を調べることにより、痛覚修飾機構における脂肪酸の役割とその作用点を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1)動物と HFC 摂取:動物としては、反応性高脂血症のモデル動物である雄性 SHRSP5/Dmcr ラットを用いた(Yamori et al., J. Cir.J. 45:1068, 1981)。A、B、C の 3 群の雄性 SHRSP5/Dmcr ラットを、さらに HFC 群(6 匹)とコントロール群(6 匹)に分けた(図 1)。HFC は、通常食(粗脂肪約 4.8%)にパーム油 25%、コレステロール 5%、コール酸 2%を添加したもの(粗脂肪約 35%)である。グループ A の HFC 群は HFC10 日摂取、グループ B の HFC 群は HFC14 日摂取、グループ C の HFC 群は HFC24 日摂取とした。各グループとも通常食で数週間飼育した後、HFC 群にのみ HFC を摂取させ、コントロール群には実験期間中を通して通常食を摂取させた。



(2)痛覚閾値: von Frey hair による足底部皮膚の機械的刺激に対する足上げ逃避反応を指標として痛覚閾値を経日的に測定した。

(3)血液・組織採取:閾値観察終了後に、ペントバルビタールナトリウムによる深麻酔下で心臓から採血した後、生理食塩水を灌流(心尖部-右心耳)して脱血した。その後、視床下部、延髄を採取し、total RNA を抽出した。

(4)血液中脂肪酸含量の測定:血清から Bligh Dyer 法により脂肪酸を抽出して、ガスクロマトグラフ法により脂肪酸含量を測定した。

(5)視床下部、延髄における脂肪酸受容体の発現:total RNA を用いて、cDNA マイクロアレイ法、RT-PCR 法により、脂肪酸受容体遺伝子の発現を確認した。

(6)Ffar1 の細胞内伝達機構：ヒト Ffar1 遺伝子を安定発現する Ffar1/CHO 細胞株を樹立して、実験に用いた。Ffar1/CHO 細胞株は、ヒト Ffar1 遺伝子発現プラスミド(HG13526-UT, Sino Biological)と 1/10 量の hygromycin 耐性遺伝子発現プラスミド(pTK-Hyg Vector, Acc. No.U40398, Chontech)を同時に CHO 細胞に導入し、hygromycin 耐性により選別した後、<sup>3</sup>[H] 標識 DHA 結合アッセイによりスクリーニングを行って、DHA 結合親和性の高い細胞株を得た。樹立した Ffar1/CHO 細胞株において、DHA が Gs タンパク質あるいは Gq タンパク質を活性化するかどうかを調べた。Gs タンパク質を介するアデニル酸シクラーゼの活性化による cAMP 産生増加は、cAMP レポーター遺伝子 (CRE-SEAP, Clontech) を導入して SEAP (分泌型アルカリ性ホスファターゼ) 活性の増加を吸光度測定により検出した。また、Gq タンパク質の活性化による細胞内カルシウム濃度の上昇は、カルシウム指示薬 (Fluo-3 AM 体, Dojin) を負荷して蛍光強度の増加を倒立蛍光顕微鏡で観察した。

#### 4. 研究成果

(1) HFC10 日摂取(C)群の痛覚閾値：HFC 摂取 3 日目から痛覚閾値の低下が観察され、10 日目の痛覚閾値は、HFC 摂取開始直前 (Day0) の  $0.47 \pm 0.03$  となった (\*  $p < 0.05$  vs. pre-HFC (Day0) by Repeated Measures ANOVA followed by Dunnett's Multiple comparison test,  $n=6$ , respectively) (図 2)。通常食を摂取したコントロール群では、有意な変化は認められなかった。

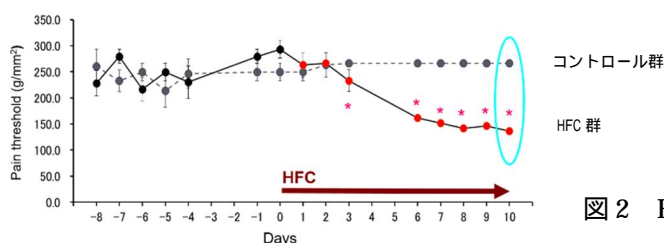


図 2 HFC10 日摂取群の痛覚閾値の変化

(2) HFC14 日(B)、24 日摂取(A)群の痛覚閾値：摂取 14 日目、24 日目の痛覚閾値は、HFC 摂取開始直前 (Day0) のそれぞれ  $0.39 \pm 0.06$  ( $n=6$ )、 $0.36 \pm 0.04$  ( $n=6$ ) であった。

(3) 餌と血清中の総脂肪酸量：HFC 餌中の総脂肪酸量は、通常食の 2 倍以上であったが、HFC10 日摂取群とコントロール群の血清中総脂肪酸量には、有意な差が認められなかった ( $p > 0.05$  vs control by Student's t-test,  $n=6$ , respectively) (図 3)。

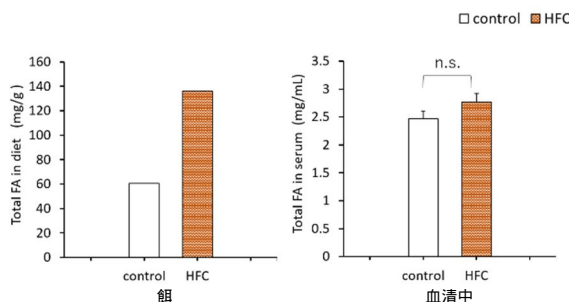


図 3 餌と血清中の総脂肪酸量

(4) HFC による血清中脂肪酸(n-6/n-3)比：各群の血清中 (n-6/n-3)比の値は、餌の(n-6/n-3)比と近い値であった。HFC 10 日摂取群の血清中(n-6/n-3)比は、コントロール群と比べて有意に高かった (\*  $p < 0.01$  vs control by Student's t-test,  $n=6$ , respectively) (図 4)。本報における HFC 群およびコントロール群における血清中の(n-6/n-3)比は、それぞれ、ヒトにおける Sibille らの値 (高い痛みレベルグループ：9.92、低い痛みグループ：5.08) に近かった。血液中脂肪酸レベルは、種を超えて痛み感覚に関連すると推測される。

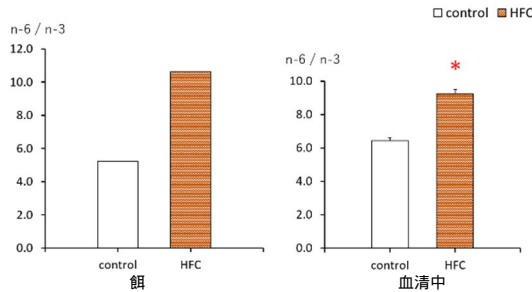


図4 餌と HFC10 日摂取群の血清中 (n-6/n-3)比

(5) HFC10 日摂取群の血清中脂肪酸含量： HFC10 日摂取群の血清中脂肪酸含量をコントロール群と比べると、16:0 と 18:1 の有意な増加、20:4n-6 と 22:6n-3 (DHA) の有意な低下が検出された ( $p < 0.05$  vs control by Student's t-test,  $n=6$ , respectively) (図5)。HFC14 日、24 日摂取群でも同様の違いが見られた。

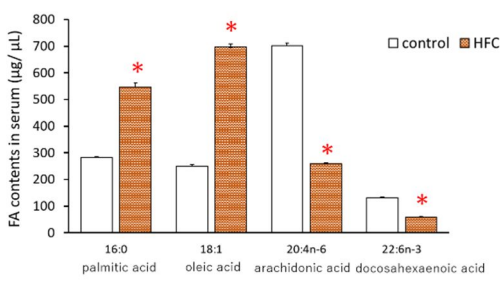


図5 HFC10 日摂取群におけるコントロール群と HFC 群における血清中脂肪酸含量

(4) 視床下部と延髄における脂肪酸受容体遺伝子の発現: HFC10 日摂取群の視床下部、延髄の cDNA マイクロアレイおよび RT-PCR 法によって、脂肪酸受容体 Ffar1、Ffar2、Ffar3、Ffar4、GPR84 の各遺伝子が視床下部および延髄に発現していることを確認した。DHA に対して高い親和性を持つ Ffar1 遺伝子の発現が確認できた。

(5) Ffar1/CHO 細胞株における DHA による Gs、Gq タンパク質の活性化: 疼痛抑制作用が報告されている DHA が、Ffar1 と共役する Gs および Gq タンパク質を活性化するか否かについて検討した。実験のために樹立した Ffar1/CHO 細胞株の DHA 結合親和性を示す Kd 値は  $1.4\mu\text{M}$  であった。Ffar1/CHO 細胞に cAMP レポーター遺伝子 (CRE-SEAP) を導入し、DHA ( $2\mu\text{M}$  あるいは  $128\mu\text{M}$ ) を添加すると、cAMP レポーター遺伝子の発現増加が認められた (図6左)。また、Ffar1/CHO 細胞にカルシウム指示薬 (Fluo-3) を負荷し、DHA ( $256\mu\text{M}$ ) を添加すると細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が観察された (図6右)。DHA は Ffar1 と共役する Gs および Gq タンパク質を活性化し、シグナル分子として働くことが確認できた。

HFC 摂取による血中の DHA レベル低下が、血液脳関門を欠く視床下部・延髄の Ffar1 を介して下行性疼痛抑制系を修飾 (抑制) したことにより痛覚過敏が生じた可能性がある。

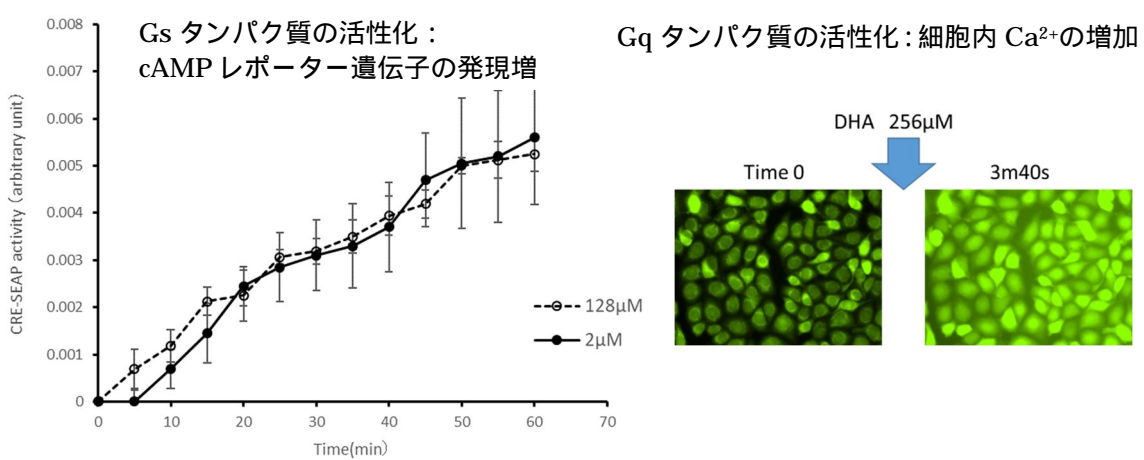


図6 Ffar1/CHO 細胞株における DHA 添加による Gs、Gq タンパク質の活性化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yasuko Kozaki, Tomomi Miyazaki, Daisuke Miyazawa, and Kazuya Kitamori	4. 巻 71 (Suppl.1)
2. 論文標題 Mechanical hyperalgesia induced by a high-fat-cholesterol diet in SHRSP5/Dmcr rats: possible involvement of fatty acids in serum (Abst.)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Physiol. Sci.	6. 最初と最後の頁 S105
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮崎智美、神谷奈美、丹羽菜緒、北森一哉、小崎康子
2. 発表標題 SHRSP5/Dmcrラットにおいて高脂肪食摂取により誘起される痛覚過敏：視床下部における長鎖脂肪酸受容体Ffar1の関与
3. 学会等名 日本薬学会第139年会（千葉）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川瀬花恋、相川黎奈、有尾清加、宮崎知美、川端千穂、鈴木日菜子、宮澤大介、北森一哉、小崎康子
2. 発表標題 SHRSP5/Dmcrラットにおいて高脂肪食摂取により誘起される痛覚過敏：延髄の痛覚修飾機構が関与する可能性
3. 学会等名 日本薬学会第140年会（京都）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小崎康子、宮崎智美、宮澤大介、北森一哉
2. 発表標題 SHRSP5/Dmcrラットにおいて高脂肪・高コレステロール食によって誘起される痛覚過敏：血清中の脂肪酸が関与する可能性
3. 学会等名 第98回日本生理学会（名古屋）
4. 発表年 2021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	北森 一哉  (Kitamori Kazuya)  (80387597)	金城学院大学・生活環境学部・教授   (33905)	

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