

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08836

研究課題名(和文)慢性疼痛時における脳内脂肪酸受容体 GPR40/FFAR1 シグナル機構の解明

研究課題名(英文)The role of brain free fatty acid receptor GPR40/FFAR1 signaling in chronic 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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、慢性疼痛時のマウス脳内における各種脂肪酸分布を明らかにすることを目的に、質量顕微鏡法をにより評価を行った。慢性疼痛モデルは、社会敗北ストレス負荷マウスへ術後痛を与え作製した。その結果、疼痛マウスの脳内において、フォスファチジルコリン中のアラキドン酸やドコサヘキサエン酸が減少していることを明らかにした。また、脂肪酸をリン脂質から切り出す酵素 iPLA2や脂肪酸結合蛋白質などの因子が、疼痛時の脳内において変化することも見出した。以上より、慢性疼痛時の脳内ではGPR40/FFAR1のアゴニストとなる各種脂肪酸が変化しており、これらを介したシグナル機構が機能低下している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

本研究は、ストレスにより誘発した慢性疼痛時の脳内では、リン脂質中の脂肪酸組成が低下していること、脂質関連因子が変化していることを見出した。これらの成果は、慢性疼痛時の脳内GPR40/FFAR1シグナル機構が機能低下している可能性を示している。したがって、将来的にこれら脂肪酸シグナルを標的とした新たな慢性疼痛治療薬の開発が期待される

研究成果の概要(英文)：In this study, brain phosphatidylcholines with docosahexaenoic acid, arachidonic acid and other long-chain fatty acids were found to have decreased in the brains of stressed mice with or without pain by using imaging mass spectrometry. Also, we demonstrated that some genes of fatty acid-related genes including iPLA2 and FABPs were changed in some brain areas of chronic pain model mice. So, endogenous agonist of a free fatty acid receptor GPR40/FFAR1 were decreased in stressed mice with or without pain. Therefore, we concluded that brain GPR40/FFAR1 signaling system could be decreased in chronic pain

研究分野：中枢薬理学、疼痛

キーワード：疼痛 脂肪酸受容体 脂肪酸

## 1. 研究開始当初の背景

### 1-1 慢性疼痛治療の現状

慢性疼痛は、組織損傷の治癒期間を超えて持続する痛みであり、痛みの原因が不明確であることが多い。また、治療効果に対する満足感が十分に得られていないとの報告もあることから、未だに有効な治療法が確立されていない (J Clin Invest, 2010)。この理由には、急性痛に対する治療が適切に行われていないとの報告もある。最近、慢性疼痛の形成と進展には様々なストレス要因が関連すると考えられている。例えば、心理社会的ストレスが強い場合、不安や抑うつなどの精神症状が現れやすく痛みの経験をネガティブに捉える破局的思考の状態に陥りやすくなるとされている。これらの詳細な機序は不明な点が多いが、心理社会的ストレスによって、脳内の疼痛関連領域における可塑的变化あるいは神経回路の形成異常などが生じていると考えられている。このように、心理社会的なストレス因子に伴い惹起される情動機能の異常は、痛みの増悪を引き起こす要因となることが示唆されている。このように現状においては、既存の鎮痛薬では痛みの伝達を抑制するといった対症療法的に痛みを緩和する役割しかもっていない。そのため痛みの原因となるこれら病態の根本的な治療には至っていない。このような背景から、心理的なストレス因子を標的とした慢性疼痛の機序解明に向けた研究や慢性疼痛患者に対する治療効果の向上を目指した創薬研究が不可欠である。

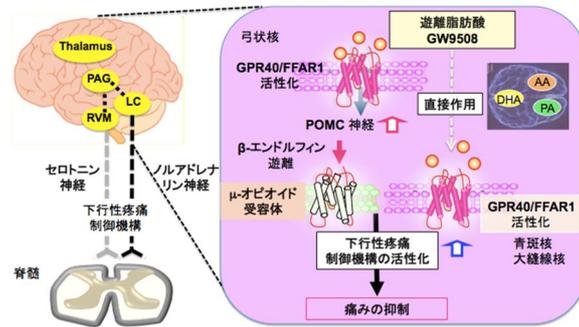
### 1-2 n-3 系脂肪酸と慢性疼痛および精神疾患との関係

上記の問題点を解決するために、申請者らはドコサヘキサエン酸 (DHA) などを含む n-3 系脂肪酸の生理作用に注目した。n-3 系脂肪酸は、生体にとって欠かすことのできない栄養素の一つであり、さまざまな生命現象に関与している。これまでに、各種疼痛に対する n-3 系脂肪酸の有効性に関する臨床試験がいくつか報告されている。例えば、関節リウマチ (Pain, 2007) や月経困難症 (Am. J. Obstet. Gynecol., 1996) などの炎症性疼痛を抑制すること、線維筋痛症や熱症に伴う神経障害性疼痛 (Clin. J. Pain., 2010) をも抑制するとの報告がある。最近、n-3 系脂肪酸と慢性疼痛に関するメタアナリシスが報告され、慢性疼痛に対してもその有効性が実証された (Pain Med, 2016)。一方、精神疾患の発症と n-3 系脂肪酸に関する研究もいくつか報告がある。近年の食生活の欧米化に伴い、この数十年間で n-3 系脂肪酸の摂取割合が劇的に減少しているとの報告もある (Lancet, 1998)。これらの低下は、うつ病や統合失調症などの精神疾患の病態形成と密接に関係しているとされている。さらに、n-3 系脂肪酸の摂取は、産後うつ病などの精神疾患の緩和やその発症率を低下させる可能性も示されている (Nat Commun, 2015)。これらの背景から、脳内の n-3 系脂肪酸を介したシグナル機構は、慢性疼痛や心理ストレスに伴う情動障害の制御に重要な役割を果たしていることが示唆されている。

### 1-3 脂肪酸受容体 GPR40/FFAR1 の中枢神経作用と申請者らのこれまでの研究

近年、各種脂肪酸がそれぞれ選択的に脂肪酸受容体(GPR40/FFAR1 など)を活性化し、種々の生理作用を發揮することが報告された(Nature, 2003)。特に、DHAのようなn-3系脂肪酸はGPR40/FFAR1のリガンドとして親和性が高い(JBC, 2003)。また、脳や脊髄などに豊富に存在していることから、中枢神経系における役割が注目されるようになった。

図1 GPR40/FFAR1を介した疼痛制御機構の可能性



申請者らはこれまでに、DHAが各種疼痛試験においてオピオイド神経系を介して痛みを抑制することを見出してきた(Nakamoto et al., Eur. J. Pharmacol., 2011)。また、DHAによる疼痛抑制作用は、GPR40/FFAR1が関与していること(Nakamoto et al., Brain Res., 2012)、脳内の脂肪酸—GPR40/FFAR1シグナル機構はβ-エンドルフィンの遊離促進を介した間接的な経路と直接的に内因性の疼痛制御機構を活性化させる経路の両方向のシグナルを介して、痛みを抑制する可能性を提唱している(図1、Nakamoto et al., PLoS One, 2013; Br. J. Pharmacol., 2015)。

#### 1-4 脂肪酸研究の現状と最新の分析技術

これまでの脂肪酸研究は、分析精度の悪さや高度な技術を要するなどの問題から生物系の研究対象として取り扱われることが少なかった。しかし最近では、質量顕微鏡による脂肪酸のイメージング解析(脂肪酸分布のみえる化)の開発や分析精度の向上にともない、脂肪酸の各組織における分布様式が明らかとなってきた(Sci Rep, 2017)。さらに生理的および病態時の条件下における各種脂肪酸の役割、さらに各種脂肪酸を認識する受容体の下流シグナルの同定およびその発現変容、また各種脂肪酸の生体内におけるシグナル機構などもわかりつつある。

#### 2. 研究の目的

これまでの申請者らの研究成果では、慢性疼痛時に脳内のどの領域における脂肪酸が変化しているのか? 本当に脂肪酸のシグナル低下が、慢性疼痛や精神疾患は発症機序に関与しているのか? について、直接的な証明はできていなかった。そこで本研究においては、慢性疼痛や慢性ストレス時の脳内n-3系を含む脂肪酸分布をイメージング技術により解明し、脳内における脂肪酸—GPR40/FFAR1シグナルの役割について、行動薬理学および質量分析手法を駆使し、上記に掲げた課題の解明を行った。

#### 3. 研究の方法

##### 3-1 動物

5~7週齢のddY系雄性および5~8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、鹿児島大学宮田篤郎教授、栗原崇准教授より分与して頂いた。

##### 3-2 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。

### 3-3 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 回繰り返す、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の増加を機械的刺激に対する過敏性ありとして評価した。

### 3-4 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。

### 3-5 Real time PCR 法

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

### 3-6 質量顕微鏡法

慢性疼痛および慢性ストレスモデルマウスの脳の凍結組織切片を作製し、組織上にマトリックススプレーを塗布し、飛行時間型質量分析計で分析し、シグナル強度比に応じて対象分子の組織切片における分布を可視化し、脳内の脂肪酸分布の変化の詳細を解析する。(浜松医科大学 瀬藤 光利 教授のご協力を得た)

### 3-7 DNA マイクロアレイ法

実験には C57BL/6J 系統の雄性マウスを用い、社会敗北ストレスを 10 日間負荷した。その後、マウスの足底部を 5 mm 切開し、術後痛を負荷した。術後痛負荷 7 日目の視床下部を摘出し、RNA 抽出を行い、DNA マイクロアレイ解析 (GeneChip、Filgen 社) を行い、非ストレス下に術後痛を与えたマウスを基準として、発現変動がある遺伝子のみを抽出した。遺伝子発現量が  $\text{ratio} > 2$ 、または  $\text{ratio} < 0.5$  の遺伝子を発現変動遺伝子とした。

### 3-8 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

### 4-1 脳内脂質関連因子の探索

疼痛モデルマウスを用いて疼痛制御機構における脳内の脂肪酸関連因子の関与について検討を行った。脳内の脂肪酸調節因子として、脂肪酸をリン脂質から切り出す酵素の calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>), cytosolic PLA<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) や脳内における脂肪酸の輸送、代謝、情報伝達に関与する fatty acid binding protein 3,5,7 (FABP3,5,7) を用いた。術後痛モデルマウスでは、機械的刺激に対して過敏反応を示した術後 2 日目の視床下部領域において、コントロール群と比較して、iPLA<sub>2</sub> mRNA, や FABP3 mRNA 発現は有意に増加した。しかしな

がら、FABP7 mRNA 発現は、上記と同条件下の術後痛モデルマウスで有意に低下した。これらの変動は、過敏反応が減弱する 4 日目において、iPLA<sub>2</sub> mRNA は 2 日目のそれに比較して低下し、FABP3 mRNA や FABP7 mRNA はコントロール群レベルまで回復した。なお、cPLA<sub>2</sub> mRNA や FABP5 mRNA は、術後痛モデルマウスにおいて何らの変化も示さなかった。さらに、CFA 投与 1 日後の痛覚過敏を示したマウスの視床下部領域で iPLA<sub>2</sub> mRNA や FABP3 mRNA はコントロール群に比較して、有意に増加した。

#### 4-2 質量顕微鏡法を用いた慢性疼痛時の脳内リン脂質変化

10 日間の社会的敗北ストレスを暴露し、慢性疼痛モデルを作製した。マウス脳内フォスファチジルコリン (PC) の組成分布は、顕微質量分析装置を用いて可視化し、マウスのそれぞれの脳部位における PC の各分子種のシグナル強度比を解析した。その結果、変動した分子種として C16:0/16:0、C16:0/18:0、C16:0/18:1、C18:1/20:4、C18:0/18:1、C18:0/20:4、C16:0/22:6、C18:0/22:6 および C18:1/22:6 を同定した。特に、術後痛惹起 7 日目の大脳皮質、視床下部、中脳および延髄領域において、ストレス暴露群はストレス非暴露群と比較して、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、アラキドン酸、ドコサヘキサエン酸を含むリン脂質が減少していることが明らかとなった。これら脳内における PC の組成の変化が、慢性疼痛の発症に少なくとも一部関与している可能性が示唆される。

#### 4-3 DNA マイクロアレイ解析

ストレス誘発術後痛モデルマウスの視床下部内における DNA マイクロアレイ解析を行い、ストレスにより痛みが慢性化した際の遺伝子発現変化について検討した。非ストレス条件下に術後痛処置を行ったマウスは、術後 1 日目から機械的痛覚過敏が認められ、術後 7 日目には消失した。一方、ストレス暴露後に術後痛処置をしたマウスは、術後 7 日目においても機械的痛覚過敏が継続した。この痛みの差異が認められた術後 7 日目の時点における視床下部 DNA マイクロアレイ解析結果から、非ストレスマウスと比べて 2 倍以上に増加した遺伝子は 278 種類、半分以下に減少した遺伝子は 137 種類であった。さらに、遺伝子オントロジーのエンリッチメント解析結果から、痛みに関連した遺伝子、炎症に関わる因子および脂質代謝に関わる遺伝子を同定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 1. Aizawa F, Sato S, Yamazaki F, Yao I, Yamashita T, Nakamoto K, Kasuya F, Setou M, Tokuyama S	4. 巻 1714
2. 論文標題 N-3 fatty acids modulate repeated stress-evoked pain chronicity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Res	6. 最初と最後の頁 218-226
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2019.03.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aizawa F, Nakamoto K, Tokuyama S	4. 巻 235
2. 論文標題 The involvement of free fatty acid-GPR40/FFAR1 signaling in chronic social defeat stress-induced pain prolongation in C57BL/6J male mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Psychopharmacology (Berl)	6. 最初と最後の頁 2335-2347
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00213-018-4930-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamoto K, Tokuyama S	4. 巻 151
2. 論文標題 The role of brain n-3 fatty acids-GPR40/FFAR1 signaling in pain	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nihon Yakurigaku Zasshi	6. 最初と最後の頁 21-26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1254/fpj.151.21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 中本賀寿夫, 徳山尚吾	4. 巻 29
2. 論文標題 精神行動制御における長鎖脂肪酸受容体 GPR40/FFAR1 の役割と創薬への可能性	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本生物学的精神医学会誌	6. 最初と最後の頁 64-68
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 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aizawa F, Nakamoto K, Tokuyama S	4. 巻 33
2. 論文標題 The involvement of GPR40/FFAR1 as a novel target of stress induced-chronic pain	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pain Research	6. 最初と最後の頁 203-213
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 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamoto K and Tokuyama S	4. 巻 33
2. 論文標題 The role of brain fatty acids in pain	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pain Research	6. 最初と最後の頁 193-202
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 橋 男、中本 賀寿夫、徳山 尚吾
2. 発表標題 疼痛モデルマウスにおける脳内脂肪酸関連因子の変動
3. 学会等名 第135回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋 男、中本 賀寿夫、徳山 尚吾
2. 発表標題 疼痛モデルマウスにおける脳内脂肪酸関連因子の変動
3. 学会等名 日本薬学会 141年会 (招待講演)
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	徳山 尚吾 (Tokuyama Shogo) (70225358)	神戸学院大学・薬学部・教授  (34509)	
研究分担者	糟谷 史代 (Kasuya Fumiyo) (80131522)	神戸学院大学・薬学部・教授  (34509)	

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