

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16938

研究課題名(和文) 生体膜リン脂質操作による神経障害性疼痛の発症維持メカニズムの解明

研究課題名(英文) Study for the mechanism underlying neuropathic pain by manipulating the membrane phospholipid

研究代表者

山本 将大 (Shota, Yamamoto)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・特任研究員

研究者番号：50825693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：神経障害性疼痛は、触刺激でさえ激しい痛みとして感じてしまう病的な慢性疼痛疾患であるが、その発症維持機構は未だ不明な点が多い。一方、細胞膜を構成するリン脂質は多様で1000分子種を超えるが、多様性を生む生体分子リゾリン脂質アシル転移酵素(LPLATs)が近年複数同定されている。本研究では、神経障害性疼痛病態時における末梢および中枢神経系組織の膜リン脂質組成と脂質メディエーター量の変化、さらに、複数系統のLPLAT遺伝子欠損マウスにおいて疼痛症状が軽減する可能性を見出した。今回の成果は、有効な治療薬の存在しない神経障害性疼痛に対してLPLATsが新しい治療標的となる可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体膜リン脂質の多様性の生理・病態学的な意義についてはほとんどブラックボックスである。本研究では、神経障害性疼痛病態時における膜リン脂質組成の変化や、リン脂質を前駆体とする脂質メディエーターの産生増加が疼痛症状の発症維持に寄与することを明らかにした。膜リン脂質組成の変化が疼痛に繋がる詳細なメカニズムについてはさらなる検討が必要だが、リン脂質多様性を制御するLPLAT欠損マウスにて疼痛軽減の表現型が得られたことは、今後のリン脂質多様性の生物学において学術的意義が認められる。

研究成果の概要(英文)：Neuropathic pain is a pathological chronic pain condition that occurs after nerve injury, and the underlying mechanisms remain unclear. Glycerophospholipids (PLs) play essential roles in our body, such as main structural components of biological membranes and precursors of bioactive lipid mediators. Over the last ten years, lysophospholipid acyltransferases (LPLATs) have been identified as the responsible genes to generate PLs diversity. In this study, we revealed that peripheral nerve injury (PNI) induced dynamic changes of PLs composition and increase of lipid mediators in the dorsal root ganglia and spinal cord. Using several mice lines lacking LPLAT gene, we found that PNI-induced chronic pain was attenuated in these mice. These findings suggest that LPLATs may be the novel target molecules to treat chronic pain.

研究分野：神経薬理学

キーワード：神経障害性疼痛 生体膜リン脂質 リゾリン脂質アシル転移酵素 脂質メディエーター

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がん、糖尿病、ウイルス感染や自己免疫疾患などに起因する慢性的な炎症や神経系組織の損傷は、麻薬性鎮痛薬モルヒネでさえも奏功しない慢性疼痛の引き金となる。中でも、神経障害性疼痛は世界人口の 7-10%に影響し、患者の生活の質を低下させるだけでなく世界経済にも損失を生み出す (*Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17002.)。しかし、その発症と慢性化するメカニズムには不明な点が多く、未だ特效薬は存在しない。

すべての細胞と細胞内小器官は生体膜に覆われており、その主要成分であるリン脂質は直接的な遺伝子制御ではなく、様々な酵素による化学反応を経て制御される。外的環境の変化や病態時にも変動し、1000 種類以上の分子種からなる多様性が存在する。また、更なる酵素反応による代謝物の一部は脂質メディエーターとして多彩な生理機能を発揮する (*Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(5):281-296.)。近年の遺伝子解析技術の発展に伴い疾患責任遺伝子を特定する研究が盛んだが、遺伝情報からは直接捉えられない「脂質代謝の情報」は不足している。疾患における包括的脂質分析や脂質関連分子に着眼した解析は、過去数十年間の病態研究で見出せなかった革新的な知見を創出できる可能性がある。

### 2. 研究の目的

神経障害性疼痛マウスモデルを用いて、疼痛症状の時間的経過に沿って一次求心性神経や脊髄後角といった神経系組織における包括的脂質解析(リン脂質や脂質メディエーター)を実施する。さらに、脂質変動に影響を与えるリン脂質合成酵素ファミリーであるリゾリン脂質アシル転移酵素 (Lysophospholipid acyltransferases: LPLATs) を探索し、その遺伝子欠損マウスを用いることで、疼痛症状における役割を明らかにする。本研究から得られる成果をきっかけに、新規治療薬開発やバイオマーカー探索へ発展させたい。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験動物

C57BL6 系の雄性マウスを 8 週齢以降に使用開始した。LPCAT1 欠損マウス、LPCAT2 欠損マウス、PAFR 欠損マウス、および LPLAT ファミリー遺伝子 (LPLAT-X) の欠損マウスを使用した。また、後根神経節 (dorsal root ganglia: DRG) neuron 特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Advillin-Cre マウス (RIKEN) を使用した。

#### (2) 神経障害性疼痛モデルの作製と疼痛行動測定

第 4 腰髄 (L4) 脊髄神経を切断する Chung モデルを用い、疼痛行動の評価には von Frey フィラメントを足の裏に押し当てマウスが足を退ける行動を観察し、50%逃避閾値 (g) を算出した。

#### (3) 脂質分析

氷冷した生理食塩水を左心室より灌流して脱血後、L4 DRG および L3-4 脊髄を採取し、液体窒素にて組織を凍結した。凍結した組織を破碎し、メタノールによる脂質抽出後、遠心分離により上清を回収した。リン脂質の測定にはこの上清を、脂質メディエーターの測定には固相抽出による精製・濃縮したものをを用い、LC-MS により測定した。

#### (4) 免疫組織染色法

氷冷した 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、L4 DRG および脊髄を採取し、浸漬固定、スクロース置換を行い、包埋した。凍結切片を作製し、抗体染色後に共焦点顕微鏡で観察した。

### 4. 研究成果

本研究では、以下の 4 項目を実施した。

#### (項目 1) 神経障害性疼痛モデルマウスの DRG および脊髄における脂質メディエーターの解析

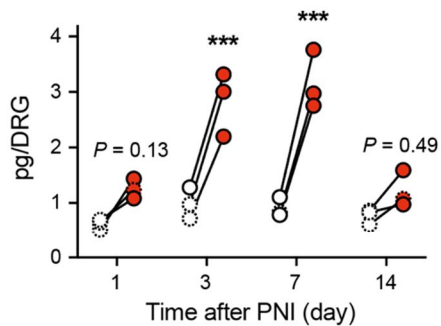
DRG および脊髄組織を神経損傷後 1 日、3 日、7 日、14 日目に採取し、脂質メディエーター約 200 種類を一斉分析したところ、3 日目より両組織で共通して血小板活性化因子 (Platelet-activating factor: PAF) が顕著に増加することを明らかにした (図 AB)。これは疼痛発症のタイムコースと一致することから、疼痛発症への寄与が考えられた。また、PAF 産生細胞を特定するため、PAF 合成酵素である LPCAT2 の特異的抗体を用いて免疫組織染色を実施した。LPCAT2 は、DRG ではマクロファージ、脊髄ではミクログリアに発現し、神経損傷後にそれら細胞数の増加に伴って発現増加することを見出した (図 C)。

#### (項目 2) PAF シグナルの疼痛に対する寄与

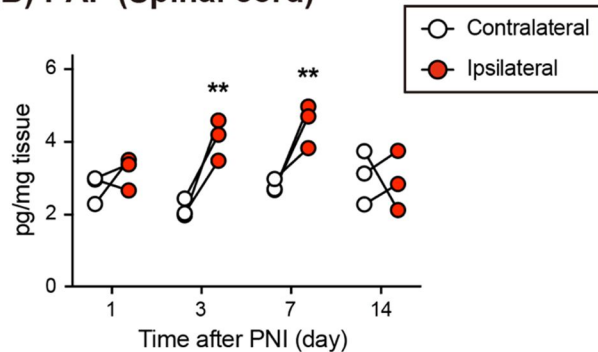
神経損傷後に増強する PAF シグナルが神経障害性疼痛に寄与するのか検証するため、LPCAT2 欠損マウスおよび PAF 受容体 (PAFR) 欠損マウスを用いて検討を行った。両マウスにおいて神経障害性疼痛モデルを作製し、疼痛評価を行ったところ、共に疼痛症状が軽減した (図 D)。一方、LPCAT2 の類似酵素である LPCAT1 欠損マウスでは野生型マウスと同程度の疼痛症状を呈した。さらに、PAF 産生が増加している神経損傷 7 日後に、PAF 受容体拮抗薬 WEB2086 を脊髄腔内投与す

ると、一過的な鎮痛効果が認められた。以上の結果から、神経損傷によって産生増加する PAF が神経障害性疼痛発症に寄与することが明らかになった。

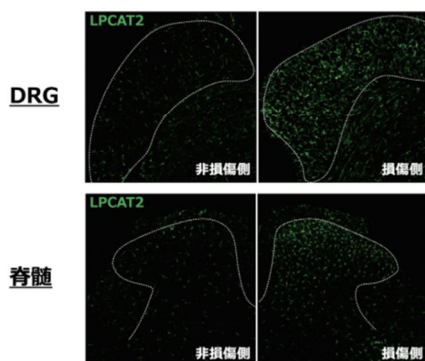
### (A) PAF (DRG)



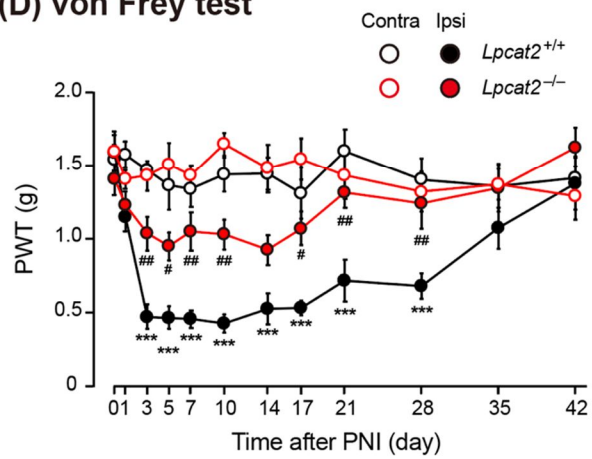
### (B) PAF (Spinal cord)



### (C) Immunohistochemistry



### (D) von Frey test



#### (項目 3) 神経障害性疼痛モデルマウスの DRG および脊髄における膜リン脂質組成の解析

DRG および脊髄組織を神経損傷後 1 日, 3 日, 7 日, 14 日目に採取し, 主要なグリセロリン脂質であるホスファチジルコリン (PC) およびホスファチジルエタノールアミン (PE) を一斉分析したところ, 特に DRG においてアラキドン酸含有 PC/PE 組成の増加とドコサヘキサエン酸含有 PC/PE 組成の減少が起こることを明らかにした。

#### (項目 4) LPLAT-X の疼痛に対する寄与

項目 3 の結果から, アラキドン酸含有リン脂質の増加に着目し, アラキドン酸含有リン脂質合成酵素 (LPLAT-X とする) の DRG neuron 特異的な欠損マウス (Adv;LPLAT-X) を作製した。Adv;LPLAT-X マウスの DRG 組織を解析したところ, アラキドン酸含有 PC/PE の低下が確認できた。このマウスで神経障害性疼痛モデルを作製し, von Frey test を実施すると, 疼痛症状が緩和していた。現在, 例数の追加を行っており更なる検証が必要であるが, 神経損傷後の疼痛症状に DRG neuron の LPLAT-X が重要な役割を担う可能性が示唆された。

本研究の結果から, 神経障害性疼痛病態時には DRG や脊髄における PAF 産生が疼痛発症のタイムコースと合致した増加を示し, 疼痛症状の形成に重要な役割を果たすことが明らかになった。さらに, 膜リン脂質組成の変動をコントロールすることで疼痛を軽減することができる可能性を提示できた。また, これまでほとんど情報のなかった神経損傷後の神経系組織におけるリピドミクス情報が得られ, 神経損傷により変動する脂質分子種を標的にした疼痛コントロールが有効な治療法になる可能性が示唆された。

PAF については DRG と脊髄のどちらで増加することが疼痛に重要なのか? 新規創薬には薬剤の中枢移行性がしばしば問題となるため, 末梢と中枢のどちらが標的なのかをはっきりさせることは今後の発展に重要である。また, 膜リン脂質の変化およびその制御がなぜ疼痛と結びつくのか? この疑問解決に向けた研究が今後の課題である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Valentine William J., Hashidate-Yoshida Tomomi, Yamamoto Shota, Shindou Hideo	4. 巻 1274
2. 論文標題 Biosynthetic Enzymes of Membrane Glycerophospholipid Diversity as Therapeutic Targets for Drug Development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Advances in Experimental Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 5~27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-3-030-50621-6_2	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 Yamamoto Shota, Egashira Nobuaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Drug Repositioning for the Prevention and Treatment of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy: A Mechanism- and Screening-Based Strategy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 607780
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2020.607780	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Yamamoto Shota, Egashira Nobuaki	4. 巻 22
2. 論文標題 Pathological Mechanisms of Bortezomib-Induced Peripheral Neuropathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 888~888
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22020888	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Eto Miki, Shindou Hideo, Yamamoto Shota, Tamura-Nakano Miwa, Shimizu Takao	4. 巻 526
2. 論文標題 Lysophosphatidylethanolamine acyltransferase 2 (LPEAT2) incorporates DHA into phospholipids and has possible functions for fatty acid-induced cell death	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 246~252
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.03.074	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本将大, 清水孝雄, 進藤英雄
2. 発表標題 “Quality of Lipid” in the dorsal root ganglion
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本将大, 吉田（橋立）智美, 進藤英雄, 清水孝雄
2. 発表標題 Platelet-activating factor (PAF) is increased in neuropathic pain mice: different regulation of PAF levels between the spinal cord and the dorsal root ganglia.
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本将大
2. 発表標題 抗がん薬オキサリプラチン誘発末梢神経障害に対する新規予防薬の探索
3. 学会等名 第29回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本将大, 吉田（橋立）智美, 進藤英雄, 清水孝雄
2. 発表標題 神経障害性疼痛マウスモデルの後根神経節および脊髄における包括的脂質解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本将大, 吉田 (橋立) 智美, 進藤英雄, 清水孝雄
2. 発表標題 神経障害性疼痛マウスモデルの後根神経節におけるリン脂質組成および脂質メディエーターの網羅的解析
3. 学会等名 第13回日本緩和医療薬学会年会
4. 発表年 2019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

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