

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K24067

研究課題名（和文）GPR34を介する疼痛発症メカニズムの多様性の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the various mechanism of the pain mediated by GPR34

研究代表者

佐世 暁 (Sayo, Akira)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50849445

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：GPR34のミクログリア以外の神経障害性疼痛のシグナル経路をマウスの行動学的および組織学的に評価した。GPR34のリガンドであるLysoPSを髄腔内投与した場合、肥満細胞欠損、マクロファージ欠損いずれのマウスにおいてわずかに疼痛が軽減した。LysoPSの髄腔内投与前後の組織学的な評価においては、肥満細胞は脱顆粒の程度に違いがあったが有意なものではなかった。マクロファージでは明らかな差は確認できなかった。GPR34を介した疼痛は本研究で着目した細胞の関与の可能性があり、これらの疼痛発症メカニズムをより詳細に解析することで神経因性疼痛の解明が進む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

神経障害性疼痛は持続的な病的疼痛であり、多くは慢性的な経過をたどる。この難治性疼痛の発症メカニズムは不明の点が多く、その解明により新たな治療法の開発が求められている。本研究は神経障害性疼痛の悪化に関与するGPR34のミクログリア以外の関与の可能性を示した。本研究が今後の治療法の開発や難治性の神経障害性疼痛の発生メカニズムの解明の一助になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The signaling pathways of GPR34 for neuropathic pain other than microglia were evaluated behaviorally and histologically in mice. Intrathecal administration of LysoPS, a ligand for GPR34, slightly reduced pain in both mast cell-deficient and macrophage-deficient mice. Histological evaluation of LysoPS before and after intrathecal administration showed that mast cells had different degrees of degranulation but were not significant. No clear difference was confirmed for macrophages before and after administration. GPR34-mediated pain may involve cells focused on this study, and it is suggested that more detailed analysis of these pain mechanisms may advance the elucidation of neuropathic pain.

研究分野：神経科学

キーワード：神経障害性疼痛 GPR34 ミクログリア マクロファージ 肥満細胞

1. 研究開始当初の背景

がん、糖尿病、帯状疱疹あるいは脳梗塞などにより神経に障害が起こると、持続的な病的疼痛である「神経障害性疼痛」が起こる。多くは慢性化の転帰をたどり既存の非ステロイド性抗炎症薬や麻薬の奏功は乏しく、本邦では約 2200 万人以上の患者が苦しんでいるとの報告がある。この難治性疼痛のメカニズムの解明による新たな治療法の開発が求められている。GPR34 は、7 回膜貫通型 G タンパク共役受容体であり、神経損傷にตอบสนองして活性化ミクログリアで発現が上昇することが、我々の以前の研究において明らかになった (Gamo et al, J Neurosci 2007)。GPR34 の内因性リガンドはリン脂質が加水分解することによって生じる LysoPS であることが最近報告された。神経損傷後にミクログリアで発現上昇する GPR34 の機能はこれまで不明であったが、研究代表者は神経損傷後の脊髄後角において内因性リガンドである LysoPS の含有量が増加傾向にあることを報告し、LysoPS / GPR34 シグナルが神経障害性疼痛に関与していることを示した (Sayo et al, J Neuroinflammation 2019)。一方、GPR34 はミクログリア以外に粘膜下組織や結合組織に存在する肥満細胞や腸管に存在するマクロファージに多く発現することが報告されている。肥満細胞は内部にあるヒスタミンをはじめとしたケミカルメディエーターを有しアレルギー反応を惹起し、マクロファージは腸上皮損傷にตอบสนองして CCL8 を産生し単球を動員することで炎症を促進する。研究代表者は予備実験でこれらの細胞が脊髄周囲に存在することを確認し、これらの細胞を介した新たな疼痛発症の可能性が浮かび上がってきた。

2. 研究の目的

GPR34 を介した神経障害性疼痛においてミクログリア以外の経路の有無を評価するために、可能性のある経路をそれぞれ欠損させ、GPR34 を介する疼痛発症のメカニズムの多様性の存在を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

8 から 12 週齢の C57BL/6 野生型 (WT) マウスとおよび各種遺伝子改変マウスの第 4、5 腰椎間 (L4、5) から 32G のカテーテルを挿入し薬剤投与モデルを製作した。LysoPS または溶媒のみの vehicle 投与後におけるミクログリア、肥満細胞、マクロファージの数と形態の評価にはそれぞれ Iba1 抗体、トルイジンブルー、CD169 抗体を用いた。マウスの疼痛は LysoPS または vehicle 投与後 1 時間おきに 4 時間および投与後 3 日目に von Frey hair test を用いて評価した。

- (1) 神経損傷後にマウスの脊髄後角で含有量の増加が確認された LysoPS または vehicle を WT および GPR34KO マウスに髄腔内投与し、脊髄のミクログリアやその周囲の肥満細胞およびマクロファージの動態を組織学的に検討した。
- (2) LysoPS または vehicle を WT および GPR34KO マウスに髄腔内投与し疼痛行動を評価した。

4. 研究成果

(1) 組織学的評価

LysoPS を髄腔内投与した後のミクログリア、肥満細胞、マクロファージの組織学的動態を評価した。ミクログリアマーカーである Iba1 で脊髄後角のミクログリアを観察したところ、LysoPS 投与群と vehicle 投与群の間で数や形態の変化はなかった。脊髄後角周囲組織の肥

満細胞をトルイジンブルーで染色し評価したところ、LysoPS 投与群において脱顆粒の程度がわずかに多かったが有意なものではなかった。LysoPS 投与後のマクロファージを CD169 抗体を用いて組織学的に評価したが、vehicle 投与群との間で明らかな違いは確認できなかった。

(2) LysoPS の疼痛の関与の評価

LysoPS または vehicle を WT および GPR34KO マウスに髄腔内投与し、von Frey hair test により疼痛を評価した。GPR34KO マウスで疼痛が軽減した。

(3) 肥満細胞の疼痛の関与の評価

肥満細胞欠損マウスを用いて LysoPS または vehicle を髄腔内投与後の疼痛を von Frey hair test を用いて確認し、肥満細胞欠損マウスでは疼痛がわずかに軽減した。

(4) マクロファージの疼痛の関与の評価

マクロファージ除去マウスを用いて LysoPS または vehicle を髄腔内投与後の疼痛を von Frey hair test を用いて確認し、わずかに疼痛が軽減した。

GPR34 を介した疼痛の発現についてミクログリア以外の経路を考慮し、そのリガンドの LysoPS を用いて行動実験および組織学的に検討したが、行動実験の結果を支持するだけの組織学的な変化は確認できなかった。GPR34 を介するシグナルは in vivo の実験においてミクログリア、肥満細胞やマクロファージの形態的变化に関与していない可能性が示唆された。一方、LysoPS 投与群においてはそれぞれの遺伝子改変マウスの疼痛の軽減がみられ、肥満細胞およびマクロファージによる疼痛経路の可能性が示唆された。これらの疼痛発症メカニズムをより詳細に解析することで神経因性疼痛の解明に大きく切り込める可能性があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Koshimizu Hiroyuki, Ohkawara Bisei, Nakashima Hiroaki, Ota Kyotaro, Kanbara Shunsuke, Inoue Taro, Tomita Hiroyuki, Sayo Akira, Kiryu-Seo Sumiko, Konishi Hiroyuki, Ito Mikako, Masuda Akio, Ishiguro Naoki, Imagama Shiro, Kiyama Hiroshi, Ohno Kinji	4. 巻 263
2. 論文標題 Zonisamide ameliorates neuropathic pain partly by suppressing microglial activation in the spinal cord in a mouse model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 118577 ~ 118577
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lfs.2020.118577	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 Sayo Akira, Konishi Hiroyuki, Kobayashi Masaaki, Kano Kuniyuki, Kobayashi Hiroki, Hibi Hideharu, Aoki Junken, Kiyama Hiroshi	4. 巻 16
2. 論文標題 GPR34 in spinal microglia exacerbates neuropathic pain in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12974-019-1458-8	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 Hara Kenji, Tsuchiya Shuhei, Hagiwara Sumitaka, Fujio Masahito, Sayo Akira, Hibi Hideharu	4. 巻 31
2. 論文標題 A dentigerous cyst associated with a supernumerary tooth (fourth molar) in the mandibular ramus: A case report	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 98 ~ 102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoms.2018.08.005	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Sayo A, Fujio M, Tsuboi M, Sakai K, Okumura D, Hibi H
2. 発表標題 Comparison of biomechanical analysis after Le Fort I osteotomy with two square-shaped and four L-shaped titanium plates using 3D-FEA
3. 学会等名 The 60th Congress of Korean Association of Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgeons (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐世 暁, 藤尾正人, 坪井亮仁, 酒井 陽, 奥村 大, 日比英晴
2. 発表標題 有限要素解析を用いたLe Fort I型骨切り術後の固定法
3. 学会等名 第66回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐世 暁, 藤尾正人, 坪井亮仁, 酒井 陽, 奥村 大, 日比英晴
2. 発表標題 異なるプレートを用いたLe Fort I型骨切り術後の生体力学的解析
3. 学会等名 第31回日本顎変形症学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐世 暁, 藤尾正人, 荻須宏太, 坪井亮仁, 酒井 陽, 日比英晴
2. 発表標題 異なるプレートを用いたLe Fort I型骨切り術後の骨片の安定性に関する検討
3. 学会等名 第30回日本顎変形症学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤尾正人, 佐世暁, 荻須宏太, 土屋周平, 酒井陽, 日比英晴
2. 発表標題 Le Fort I型骨切り術の固定法と術後の骨片変位量の検討
3. 学会等名 第64回日本口腔外科学会総会 学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Kazuto Okabe, Akira Sayo, Yuya Ohta, Go Ohara, Noriyuki Yamamoto, Hideharu Hibi.	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Japanese Stomatological Society	5. 総ページ数 54
3. 書名 Infected bone substitute after the bone augmentation in the maxilla: A case report.	

〔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
---------	---------