

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09190

研究課題名(和文) 疼痛遷延化に関わる局所炎症反応とリゾリン脂質の役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of role of lysophospholipids and local inflammation in prolonged pain

研究代表者

伊藤 伸子 (Ito, Nobuko)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80332609

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)：細胞膜構成脂質であるリゾホスファチジン酸(LPA)がどのように急性疼痛や脊柱管狭窄症による疼痛に関与しているのか解析した。神経根圧迫による脊柱管狭窄症モデルを用い、LPA合成酵素オートタキシン(ATX)の阻害剤について効果を検証した。ATX阻害薬投与により有意な疼痛抑制効果と脊髄グリア細胞活性化減弱が認められた。急性組織障害性疼痛に対するLPA受容体シグナル関与についても研究を進めた。LPA受容体拮抗薬前投与により、有意な自発的疼痛行動の減弱と後根神経節衛星グリア細胞活性化減弱が認められ、LPA受容体が急性疼痛メカニズムにも関与していることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

坐骨神経損傷による神経障害性疼痛モデルではなく、よりヒト病態に近い神経根型脊柱管狭窄症モデルを用いて、LPA産生酵素ATX阻害による鎮痛効果を検証できた。ATX阻害により髄液中のLPAは顕著に減少しており、脊髄神経周囲でのLPA産生が疼痛病態に強く関わっていることと、新規治療薬としての可能性が示された。急性疼痛モデルでLPA受容体拮抗薬が疼痛抑制効果を示したことは、副作用の多い非ステロイド性鎮痛薬以外の鎮痛薬としての可能性が示された。また急性疼痛時にも後根神経節でLPA/LPC上昇が検出され、衛星グリア細胞の変化が認められたことから、衛星グリア細胞をターゲットとした疼痛制御の重要性がわかった。

研究成果の概要(英文)：We analyzed how lysophosphatidic acid (LPA), a cell membrane constituent lipid, is involved in acute pain and pain caused by spinal canal stenosis. Using a spinal canal stenosis model of nerve root compression, the effects of inhibitors of the LPA synthase, autotaxin (ATX) were examined. Significant pain suppression and attenuation of spinal glial cell activation were observed after treatment with ATX inhibitors. Involvement of LPA receptor signaling in acute tissue-injurious pain was also studied. Preadministration of LPA receptor antagonist significantly attenuated spontaneous pain behavior and activation of satellite glia cell of dorsal root ganglion, indicating that LPA receptors are also involved in acute pain mechanisms.

研究分野：麻酔学

キーワード：脂質 疼痛学 神経科学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛の原因となる生理活性脂質としてリゾホスファチジン酸(LPA)が注目され、その受容体 LPA1 シグナルが強く関与していることが遺伝子改変動物や受容体拮抗薬を用いた研究によって証明され国内外の多くの報告がある。これらの報告の多くは齧歯類の坐骨神経部分結紮による神経損傷や末梢神経を直接損傷する抗がん剤投与モデルを主体としており、LPA-LPA1 シグナルによる損傷後神経の脱髄機構がアロデイニアを引き起こしていることを報告しているが、急性期の LPA 産生や LPA 受容体シグナルの関与については知られていない。また、よりヒトの脊柱管狭窄症に近い病態モデルでの解析はされていない状況であった。

2. 研究の目的

疼痛の病態形成に対し、リゾホスファチジン酸(LPA)がどのように関与しているのか解明する。LPA は組織障害時にホスホリパーゼ A2(PLA2)を初発酵素として産生される生理活性脂質の一つであり、また別経路として血液中や髄液中の変換酵素 Autotaxin (ATX)によってリゾホスファチジルコリン(LPC)より産生される。組織障害早期に LPA がどこで産生され、どの受容体を介し、末梢組織レベル・神経節レベル・脊髄レベルでどのような変化をもたらすのか解明する。それらを適切な時期に抑制することにより疼痛遷延化を阻止し、効果的な治療法を開発することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1)神経根型腰部脊柱管狭窄症モデルでの解析

生後 10-16 週の雌性成熟 SD ラット (n=5-7)を使用しイソフルレン麻酔下に腰部切開し片側第 5 腰椎後根神経節と神経根上に L 字型ステンレスロッドを挿入し腰部脊柱管狭窄症モデル (神経根圧迫型) を作成した。阻害剤投与を行わない予備実験にてロッド挿入 1 日目よりロッド挿入側足裏の機械的刺激による逃避閾値の減弱が認められ、時間経過とともに閾値はさらに低下し、疼痛反応が継続していることを確認した。LPA 変換酵素 ATX 阻害剤をロッド挿入前から挿入 28 日まで毎日経口投与し、機械的刺激による逃避閾値を計測した。Naïve, Sham, ロッド挿入 1 日、ロッド挿入 7 日、ロッド挿入 14 日、ロッド挿入 28 日で腰部脊髄組織、後根神経節の採取と髄液採取を行い、高速液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析(LC-MS/MS)法により各種 LPA とその前駆体である LPC の定量分析を行った。同様の時系列で脊髄組織の免疫染色を行い、脊髄へのミクログリア集積とアストロサイト集積を解析した。統計は 2-way ANOVA with Bonferroni を使用し時系列で比較した。

(2)急性組織障害性疼痛モデルでの解析

生後 10-16 週の成熟 C57BL/6 マウス(n=5-7)を使用し透明ケージ内での馴化後、足底に 5%ホルマリン 10 μ l 注入したのち、注入側肢を振る・舐める自発的疼痛行動時間を 5 分おきに 1 時間計測した。ホルマリン注入前 30 分に LPA 受容体拮抗薬群には LPA 受容体拮抗薬の腹腔内投与を、コントロール群には Vehicle の腹腔内投与を行い比較した。さらに足底局所投与による鎮痛効果についても解析した。RNA scope 法を用いて後根神経節における LPA1 受容体の発現部位を解析した。足底ホルマリン注入後の足底組織、後根神経節を採取し、炎症性サイトカイン、グリア細胞マーカー GFAP の LPA 受容体拮抗薬投与による発現変化を解析した。免疫染色により後根神経節のリン酸化 ERK, 脊髄後角リン酸化 CREB について LPA 受容体拮抗薬投与による活性化変化を解析した統計は 2-way ANOVA with Bonferroni を使用し両群を比較した。

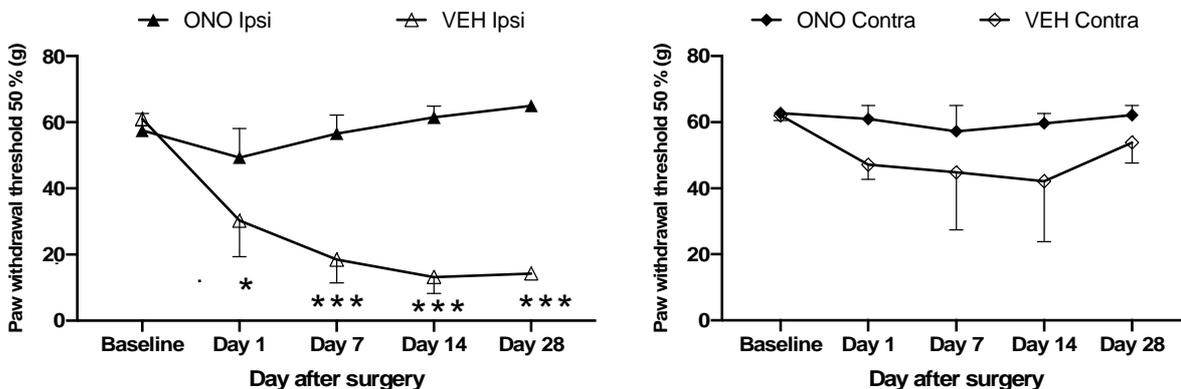
4. 研究成果

(1) 神経根型腰部脊柱管狭窄症モデルでの解析

(1)-1 機械的刺激に対する疼痛反応に対する ATX 阻害剤の効果

図(1)-1

ONO: ATX 阻害剤群 VEH: Buffer 群



$P < 0.05^*$, $P < 0.001^{***}$

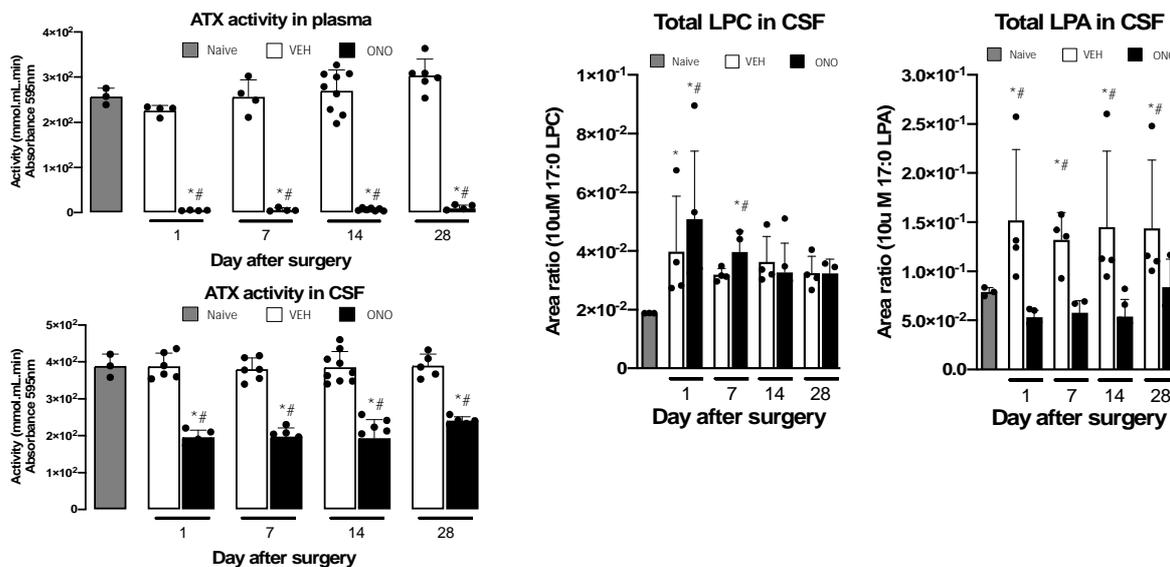
L5 神経根圧迫側で足裏の機械的刺激による逃避閾値低下が認められ、ATX 阻害剤投与群でこの反応が有意に抑制されていた。

(1)-2 髄液中リゾリン脂質解析

ATX 阻害剤投与により、血漿中の ATX 酵素活性の顕著な低下が認められた。

ATX 阻害剤群の髄液中で LPA 含量の有意な低下と ATX 酵素活性低下が認められた。また、免疫染色解析により、ロッド挿入 28 日の脊髄ミクログリア集積とアストロサイト集積が ATX 阻害剤投与群で有意に抑制されていた。

図(1)-2



これらの結果から、ATX 阻害薬による LPA 産生抑制が脊髄ミクログリア並びにアストロサイト活性化を減弱し、神経根型の脊柱管狭窄症の疼痛抑制に効果を発揮することが分かった。神経圧迫による LPC の髄液中漏出と LPA 変換を抑制することが、脊柱管狭窄症による疼痛治療の標的となり、ATX 阻害薬の鎮痛薬としての可能性が示された。

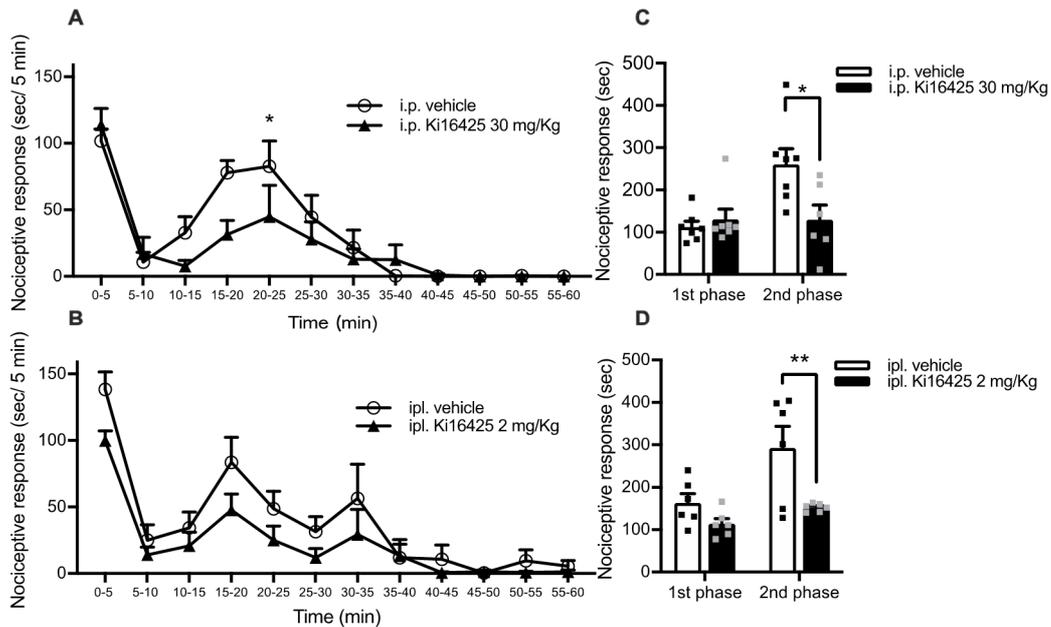
(2) 急性組織障害性疼痛モデルでの解析 (図(2)-1)

急性組織障害性疼痛モデルとして古典的に知られているホルマリンテストを用い、LPA1/3 受容体拮抗薬の疼痛抑制効果について解析を進めた。

(2)-1 ホルマリンテストによる自発疼痛行動解析

LPA1/3 受容体拮抗薬前投与により、ホルマリン足底注入による侵害受容反応は有意に抑制されていた。疼痛反応抑制は LPA1/3 受容体拮抗薬の腹腔内投与だけでなく、足底局所注入でも認められた。この結果は雌性マウスでも同様であった。

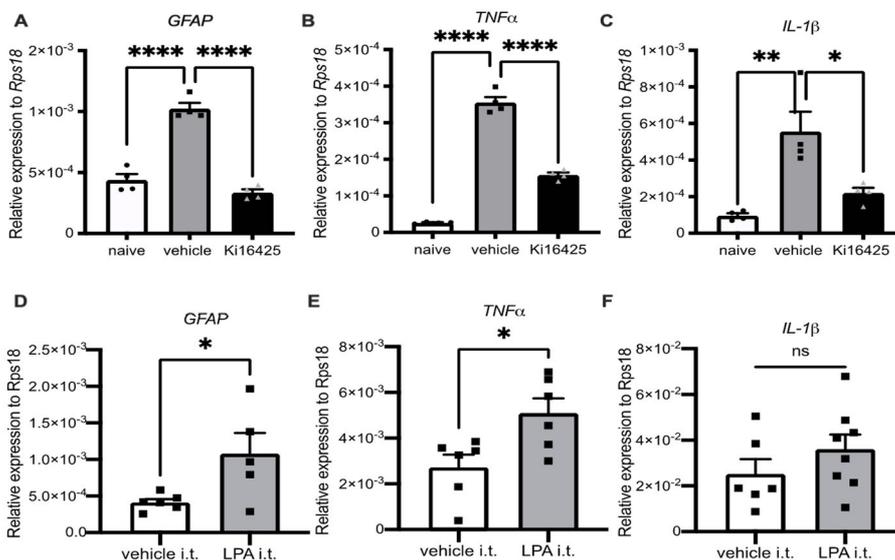
図(2)-1



(2)-2 LPA1 受容体発現と LPA 受容体拮抗薬の効果 (図(2)-2 A,B,C)

LPA1 受容体の発現は足底組織よりも腰部後根神経節の衛星グリア細胞に認められ、特に A δ 神経細胞周囲の衛星グリア細胞に発現していた。ホルマリン足底注入によりこれら衛星グリア細胞で ERK 活性化と脊髄後角 CREB 活性化が認められたが、LPA1/3 受容体拮抗薬により抑制されていた。ホルマリン足底注入による後根神経節での TNF α , IL-1 β , 及び GFAP の発現増加も LPA1/3 受容体拮抗薬により抑制されていた (図(2)-2 A, B, C)。このモデルの足底組織中で数種の LPC 分子種の上昇が、さらに腰部後根神経節で数種の LPA 分子種の上昇が認められた。

図(2)-2



(2)-3 LPA 髄液注入による後根神経節遺伝子変化 (図(2)-2 D,E,F)

LPA 髄液注入により、ホルマリン足底注入時と同様に後根神経節での TNF α , IL-1 β , 及び GFAP

の発現増加が認められた。

急性組織障害により後根神経節で LPA 産生が増加し、後根神経節でサイトカイン上昇が生じ、後根神経節に存在する衛星グリア細胞に発現する LPA1 受容体を介して衛星グリア細胞が活性化することで、脊髄後角へのシグナルが増強され急性疼痛が修飾されていることが示唆された。LPA1 受容体と衛星グリア細胞が新たな急性疼痛治療ターゲットとなり得ることが分かった。

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 Hoshino Yoko, Okuno Toshiaki, Saigusa Daisuke, Kano Kuniyuki, Yamamoto Shota, Shindou Hideo, Aoki Junken, Uchida Kanji, Yokomizo Takehiko, Ito Nobuko	4. 巻 36
2. 論文標題 Lysophosphatidic acid receptor 1/3 antagonist inhibits the activation of satellite glial cells and reduces acute nociceptive responses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e22236
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202101678R	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 Uranbileg Baasanjav, Nobuko Ito, Makoto Kurano, Kuniyuki Kano, Kanji Uchida, Masahiko Sumitani, Junken Aoki, Yutaka Yatomi	4. 巻 11
2. 論文標題 Inhibition of autotaxin activity ameliorates neuropathic pain derived from lumbar spinal canal stenosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3984
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-83569-3.	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 Asahara Miho, Ito Nobuko, Hoshino Yoko, Sasaki Takaharu, Yokomizo Takehiko, Nakamura Motonao, Shimizu Takao, Yamada Yoshitsugu	4. 巻 17
2. 論文標題 Role of leukotriene B4 (LTB4)-LTB4 receptor 1 signaling in post-incisional nociceptive sensitization and local inflammation in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0276135
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0276135	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 星野陽子、伊藤伸子、奥野利明、横溝岳彦、内田寛治
2. 発表標題 マウス急性炎症性疼痛モデルに対するリゾフォスファチジン酸受容体シグナルの役割
3. 学会等名 日本麻酔科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Baasanjav Uranbileg、伊藤伸子、蔵野信、矢富裕
2. 発表標題 Inhibition of the autotoxin activity ameliorates neuropathic pain symptoms derived from a lumbar spinal stenosis
3. 学会等名 日本検査医学会
4. 発表年 2020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	星野 陽子 (Hoshino Yoko) (80920503)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	

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