

機関番号：2132622000  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21700436  
 研究課題名(和文) 神経因性疼痛・線維筋痛症の発症メカニズムの解析  
 研究課題名(英文) Screening and studies of new targets for fibromyalgia by chemical methods  
 研究代表者 澤 智華 (SAWA CHIKA)  
 昭和大学・医学部・助教  
 研究者番号：80422541

## 研究成果の概要(和文)：

線維筋痛症に奏効のある薬剤の生体内標的分子を単離・同定し薬理機構の解明を目的とした。本研究では、2種類の薬剤誘導体を用い、薬剤の構造部位ごとに認識する標的因子を探索した。市販のガバペンチン誘導体Iと新規合成したガバペンチン誘導体IIを用いて微粒子への固定化とマウス脳抽出液からの標的分子の探索を試みた。微粒子に対する薬剤の固定化位置の違いによって単離される薬剤標的分子が異なるということは、標的分子が薬剤の化学構造を十分に認識しているものと推察され、2つの結果を比較することで、今後の創薬開発研究に対して意義ある情報が提供できるものと考えられる。

## 研究成果の概要(英文)：

Fibromyalgia Syndrome (FMS) is a chronic condition characterized by widespread pain and tenderness on examination, along with symptoms of sleep disorder, fatigue, and cognitive difficulties. FMS occurs in about 2 percent of the population in the United States and Japan (i.e. about two million patients are expected in Japan). Women are much more likely to develop the disorder than men, and the risk of FMS increases with age. FMS often begin after a physical or emotional trauma, but there is no blood test or biomarker that can conclusively determine the disease. It is reported that Gabapentin and Pregabalin has been worked very well for many FMS patients. But molecular mechanism of these two medicines for FMS is still unclear.

We planed to screen interacting proteins of these two drugs, and study medicinal actions of nervous system in particular.

To be concrete, we synthesized a new Gabapentin Fmoc-derivative and immobilized 2 kinds of Gabapentin derivatives to magnetic nano-beads and screen for interacting proteins by affinity purification from mouse brain extract.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：疼痛・線維筋痛症・神経疾患・ケミカルバイオロジー

## 1. 研究開始当初の背景

線維筋痛症は、全身の激しい疼痛を主症として不眠、全身の疲労感や種々の精神神経症状を伴う原因不明の疾患である。重症な患者になると、髪や爪に触れただけでも痛みを感じ、患者の QOL (Quality Of Life) に大きな支障をきたしている。本症によって患者自身の命を落とす事はないが、激しい疼痛のため精神的に圧迫され、自殺や社会的事件を起こすケースが報告されており、早急に原因解明をする必要がある。本邦では、厚生労働省の本症に対する調査研究班の疫学調査の結果では人口の 1.66% に発症し、とくに働き盛りの中年女性に多い割合である事が報告されている。これは、国内で推定 200 万人を越す線維筋痛症の患者がいることを示しており、就労不能となればその社会的損失は甚大である。

原因は不明で突如発症する事が多いようだが、圧倒的に中高年の女性に多く、事故や手術などの身体的な負荷要因や、幼少期のトラウマ、家族や友人間での人間関係、生活や仕事上でストレスを感じやすいなど精神的な負荷要因をかかえているケースがほとんどである。これらは原因と特定できないが、リスクファクターとして線維筋痛症を誘発しうるものであるとする考え方がある。このように非常に多く患者が存在するにもかかわらず、本疾患に対する的確な診断や治療が十分にされていないのが現状である。

一番の問題は線維筋痛症に対する血液検査、X 線検査を含め、診断マーカーが確立されていないことである。そのため患者は“線維筋痛症”を熟知している医師から臨床的診断を得るまで治療を開始できずに、また周囲からの理解も得られずに苦しむケースが多い。

そのため、本疾患の診断マーカーの確立と本症の原因及び発症メカニズムの解析は急務である。

上記に示したように線維筋痛症の発症原因はまだ明らかにされていない。臨床データからは明確な遺伝的要因の存在は示されていない (家族間発症率 3.8%)。本邦には線維筋痛症に対する承認された薬剤はないが、FDA では現在、“プレガバリン (商品名 リリカ)” 及び“デュロキセチン (商品名 シンバルタ)” が承認されており、“ガバペンチン (商品名 ガバペン)” も効果が確認されている。本邦ではまだ治験の段階である。これらの薬剤は元々抗てんかん薬 (プレガバリ

ン・ガバペンチン)、抗うつ薬 (デュロキセチン) として開発されているが、痛覚における作用メカニズムは未だ十分には明らかにされていない。

そのため、これらの薬剤の“神経機構における薬理機構”を解明することにより、本症の発症メカニズムや原因の解明に繋がると考えられる。

## 2. 研究の目的

線維筋痛症に奏効のある薬剤 (ガバペンチン等) の生体内標的分子を単離・同定し、薬剤の薬理機構を解析し、本症の発症原因を分子レベルで解明する。

## 3. 研究の方法

本研究で利用したナノテクノロジーは当研究室が独自に開発した機能性磁性微粒子 (FG ビーズ) である。FG ビーズは適度な親水性と高い分散性を有する高性能アフィニティ精製用担体であり、磁性酸化鉄のフェライト (ferrite) をコアに持ち、最表面がポリグリシジルメタクリレート (ポリ GMA) で均一に覆われているため、GMA のエポキシ基を利用して様々なリガンドを共有結合により微粒子上に固定化することが可能である。本技術の特長は、細胞粗抽出液から薬剤結合タンパク質をワンステップでアフィニティ精製できることであり、比較的弱い結合因子も簡便に単離することができ、相互作用する複合体を一挙に単離することも可能である。

本研究では、2 種類の薬剤誘導体を用い、それぞれの薬剤の構造部位ごとに認識する標的因子を探索した。これにより、標的とする薬剤の化学構造を決定することが可能となり、薬剤の構造活性相関の情報が得られる。

本研究班の臨床研究から、線維筋痛症は中枢神経系の異常と考えられているため、本研究ではマウス脳抽出液からの生体内薬剤標的分子の精製を検討した。タンパク質抽出液は細胞質画分と細胞膜画分を調整した。細胞質画分は Dignam らの報告を参考に調製し、細胞膜画分は界面活性剤オクチルグルコシドを用いて調製した。

## 4. 研究成果

平成 21 年度は市販のガバペンチン誘導体 I (Fmoc-Gabapentin, NeoMPS, France) を用いてガバペンチンの微粒子上への固定化とマウス脳抽出液からの標的分子の探索を試みた。誘導体 I の微粒子上への固定化ではガバペンチンのカルボキシル基を利用するため、アミノ基付近部位を認識する標的分子が得られると予想された。これと並行して、ガ

バペンチン分子を認識する標的分子を得るべく、ガバペンチンのアミノ基、カルボキシル基以外で微粒子に固定化できる官能基を用意した新規ガバペンチン誘導体 II を外注した（新成化学、大阪）。ガバペンチン誘導体 I 固定化微粒子を用いて、野生型成体マウスの全脳組織（細胞質画分と細胞膜画分）から標的因子をアフィニティ精製したところ、細胞膜画分からガバペンチンに特異的に結合する因子が検出され、アクチンと判明した。

平成 22 年度はガバペンチン誘導体 II 固定化微粒子の調整を検討した。誘導体 II の合成は困難だったが、最終的には合成に成功した。固定化モデル実験として、スクシンイミドを有する微粒子に対して Fmoc リジンを固定化したところ、十分量のリジンが微粒子上に固定化されることが分かった。同様の手法を用いてガバペンチン誘導体 II の固定化を試み、誘導体 II が固定化された微粒子の作製に成功した。現在、この微粒子を用いたガバペンチン標的因子のアフィニティ精製を検討している。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 4 件）

- ① Sawa C., Oka H., Yamano Y., Aoki J., Ueda H., Nishioka K. Increased serum levels of lysophosphatidylcholine in fibromyalgia patients. *Annals of the Rheumatic Diseases* (in submitting) 査読有
- ② Araya N., Takahashi K., Sato T., Nakamura T., Sawa C., Oka H., Nishioka K., Nakajima T., Mori N., and Yamano Y. Fucoidan therapy decreases the proviral load in patients with human T-lymphotropic virus-type1-associated neurological disease. *Antiviral Therapy* Antivir Ther. 2011;16(1):89-98. 査読有
- ③ Masaike Y., Takagi T., Hirota M., Yamada J., Ishihara S., Yung TM, Inoue T., Sawa C., Sagara H., Sakamoto S., Kabe Y., Takahashi Y., Yamaguchi Y., Handa H. Identification of Dynamin-2-mediated Endocytosis as a New Target of Osteoporosis Drugs,

Bisphosphonates. *Molecular Pharmacology* 2010,77(2):262-9. 査読有

- ④ Wada H, Yasuda T, Miura I, Watabe K, Sawa C., Kamijuku H, Kojo S, Taniguchi M, Nishino I, Wakana S, Yoshida H, Seino K. Establishment of a superior mouse model for infantile neuroaxonal dystrophy bearing a point mutation in Pla2γ6 which shows early disease onset. *The American Journal of Pathology* 2009;175(6):2257-63査読有

〔学会発表〕（計 3 件）

- ① 第 1 回 線維筋痛症学会  
2009 年 10 月 11 日 三重県津市  
線維筋痛症患者における血清中リゾホスファチジルコリン濃度の上昇
- ② 第 5 回 核酸・核タンパク機能性研究会  
2010 年 8 月 6 日 北海道恵庭市  
LPS 単回投与によるマウス肝臓障害モデルに対する核酸・核タンパク摂取の効果
- ③ 第 116 回 日本解剖学会  
2011 年 3 月 28-30 日 (HP 上開催) 横浜  
Functional Analysis of Nucleoprotein diet from salmon testis, *Shirako* via Intestinal IgA secretion

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤 智華 ( Sawa Chika )  
昭和大学・医学部・助教  
研究者番号：80422541

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし