

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860060

研究課題名(和文)慢性疼痛に伴う精神症状における脳内炎症の関与と抗炎症性脂質レゾルビンD1の有効性

研究課題名(英文) Involvement of neuroinflammation in the negative affective component of chronic pain: Effect of resolvin D1, an anti-inflammatory lipid mediator

研究代表者

出山 諭司 (DEYAMA, Satoshi)

北海道大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：30634993

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)：本研究では、抗炎症性脂質レゾルビンD1(RvD1)が、慢性疼痛に伴う脳内炎症及び精神症状に有効か否かを明らかにすることを目的として解析を行った。炎症によるうつ病発症を模倣したりボロリサッカライド(LPS)誘発うつ病モデルにおいて、RvD1及びレゾルビンD2(RvD2)側脳室内投与がmTOR経路活性化を介して抗うつ作用を示すことが明らかとなった。今後、慢性疼痛モデル動物を用いて、RvD1及びRvD2が慢性疼痛による精神症状に有効であるか検討を行う必要がある。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we aimed to assess the effects of resolvin D1 (RvD1), an anti-inflammatory lipid mediator, on chronic pain-induced neuroinflammation and the negative affective states. Intracerebroventricular injections of RvD1 or resolvin D2 (RvD2) exerted antidepressant-like effects against lipopolysaccharide-induced depression-like behavior, a rodent model of inflammation-induced depression, via activation of mTOR signaling. Further investigations are required to verify whether RvD1 and RvD2 improve the negative affective states in a chronic pain model.

研究分野：神経薬理学

キーワード：レゾルビンD1 レゾルビンD2 抗うつ作用 mTOR経路 -3系脂肪酸 DHA

## 1. 研究開始当初の背景

痛みにより生起される不安、抑うつ、嫌悪などの負情動は、患者のQOLを著しく低下させるだけでなく、特に慢性疼痛下では精神疾患、情動障害の引き金ともなり、このような精神状態が痛みをさらに悪化させるという悪循環を生じさせる。このことは、痛みの感覚的側面だけではなく、情動的側面をも考慮した疼痛治療の必要性を示唆している。

近年、脳内炎症が、うつ病や不安障害などの精神疾患の原因であるとする仮説に注目が集まっており、IL-1、TNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカイン、プロスタグランジン、活性酸素種などの炎症関連分子の精神疾患への関与が示唆されている。このことから、これらの炎症関連分子の阻害薬が、慢性疼痛に伴う精神症状の治療に有用である可能性があるが、個々の炎症関連分子に対する阻害薬よりも、これらの炎症関連分子の産生を広範に抑制する薬物のほうが、より高い抗うつ・抗不安効果が期待できるものと考えられる。このような抗炎症作用を有する候補物質として、研究代表者は、 $\omega$ -3系脂肪酸(ドコサヘキサエン酸(DHA)、エイコサペンタエン酸)の代謝産物で、炎症収束に積極的に関わる抗炎症性脂質メディエーターであるレゾルビンに着目した。2010年に、レゾルビンを脊髄腔内や炎症部位局所に投与することで、感覚神経や脊髄神経において炎症関連分子の発現が抑制されるとともに、レゾルビンがTNF- $\alpha$ による情報伝達やTRPチャンネルの機能を抑制し、強力な鎮痛作用が得られることが報告された(Xu et al. Nat Med 2010)。しかしながら、脳内におけるレゾルビンの作用については、ほとんど目が向けられていないのが現状である。DHAが脳内に豊富に存在することを考えると、その代謝産物であるレゾルビン D1 (RvD1) や D2 (RvD2) が、脳内炎症の抑制、並びに精神症状の改善に寄与する可能性が十分に考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、脳内炎症及び慢性疼痛による精神症状に対するRvD1の効果とその作用機序を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 脳スライス培養系を用いた分子生物学的解析

生後6-7日齢のマウスから海馬あるいは大脳皮質-線条体スライス(300 $\mu$ m)を作製し、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>環境下で10日間培養した。培養11日目に、リポポリサッカライド(LPS)処置(10 ng/mL、6時間)を行った。RvD1(100 nM)はLPS処置と同時に培地中に添加した。

LPS処置後に脳スライスを回収し、各種炎症関連分子 mRNA の相対的定量をリアルタイム RT-PCR 法により行った。

(2) 行動薬理学的解析

側脳室内(i.c.v.)投与

抱水クロラル(400 mg/kg)麻酔下、雄性BALB/cマウスにi.c.v.投与用25Gガイドカニューレを刺入し、歯科用セメントにて固定した。マウスは手術後7日目以降に実験に用いた。i.c.v.投与は、行動薬理試験の2時間前に33Gインジェクションカニューレをガイドカニューレに刺入し、マイクロインジェクションポンプを用いて、5 $\mu$ Lの容量を2分かけて投与した。

LPS 処置

炎症によるうつ病の発症を模倣したモデルとしてLPS誘発うつ病モデルを用いた。マウスにLPS(0.8 mg/kg)を腹腔内(i.p.)投与し、その24時間後に行動薬理試験を行った。

尾懸垂試験

マウスの尾をテープで試験装置天井のフックに固定して逆さ吊りにし、6分間の無動時間を計測し、うつ状態の指標とした。

オープンフィールド試験

マウスをオープンフィールド(W 40 cm x L 40 cm x H 35 cm)中央に投入し、10分間の総移動距離を自動解析装置により計測し、自発運動量の指標とした。

## 4. 研究成果

(1) 脳スライス培養系を用いたRvD1の炎症抑制作用の検討

RvD1が脳内において炎症抑制作用を示すか否かを明らかにするために、マウス海馬スライスあるいは大脳皮質-線条体スライス培養系を用いて、LPS処置による炎症関連分子 mRNA 発現上昇に対するRvD1処置の効果を検討した。LPS処置により、炎症性サイトカイン(IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ )、ケモカイン(MCP-1、MIP-1)、シクロオキシゲナーゼ2(COX2)、誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS) mRNA 発現の上昇が認められた。これらの mRNA 発現上昇は、陽性対照薬デキサメタゾン(1 $\mu$ M)処置により抑制されたが、RvD1(100 nM)処置では抑制されなかった。

(2) LPS誘発うつ病様行動に対するRvD1及びRvD2 i.c.v.投与の効果

LPS投与により、尾懸垂試験における無動時間が有意に増加し、うつ病様行動が惹起された。LPSによる無動時間の増加は、RvD1 i.c.v.投与により用量依存的に抑制され、10 ngの投与により有意に抑制された。また、LPSによる無動時間の増加は、RvD2 10 ng i.c.v.投与によっても有意に抑制された(図1A)。一方、LPS投与、RvD1及びRvD2 i.c.v.投与は自発運動量に影響を及ぼさなかった(図1B)。これらの結果から、RvD1及びRvD2が抗うつ作用を示すことが明らかとなった。

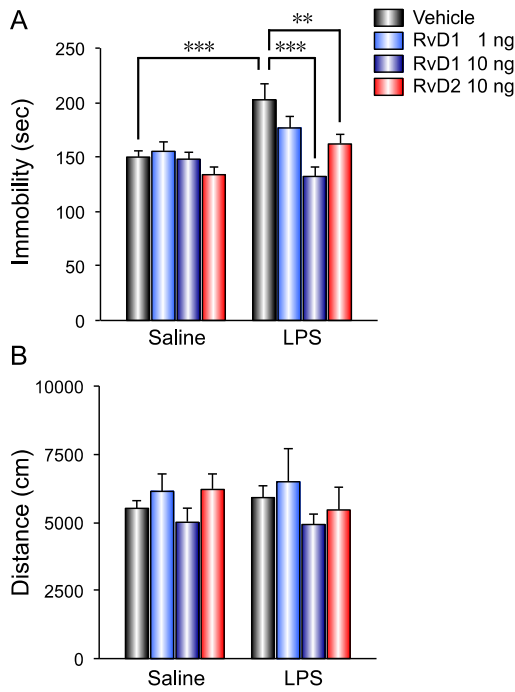


図 1 LPS 誘発うつ病モデルに対する RvD1 及び RvD2 i.c.v. 投与の効果 (A)尾懸垂試験における無動時間、(B) オープンフィールド試験における総移動距離。  
\*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001

### (3) RvD1 及び RvD2 の抗うつ作用メカニズムの検討

脳スライス培養系を用いた検討において、RvD1 が炎症関連分子 mRNA 発現上昇を抑制しなかったことから、RvD1 及び RvD2 の抗うつ作用には、これらの分子の発現上昇抑制とは別のメカニズムが関与している可能性が考えられた。末梢組織・細胞において、RvD1 の作用に PI3 キナーゼ経路が関与していることが報告されていることから (Odusanwo et al, Am J Physiol Cell Physiol 2012; Wang et al. J Immunol 2014) まず RvD1 及び RvD2 の抗うつ作用における PI3 キナーゼの関与について検討を行った。PI3 キナーゼ阻害薬 LY294002 (3 µg) を RvD1 あるいは RvD2 と同時に i.c.v. 投与したところ、RvD1 の抗うつ作用は有意に抑制された。一方、RvD2 の抗うつ作用は、LY294002 同時投与による影響を受けなかった (図 2A)。また、いずれの薬物も自発運動量には有意な影響を及ぼさなかった (図 2B)。この結果から、PI3 キナーゼ活性化は、RvD1 の抗うつ作用に関与しているが、RvD2 の抗うつ作用には関与していないことが明らかとなった。

次に、RvD1 及び RvD2 の抗うつ作用における ERK の関与について検討を行った。ERK の上流の MEK の阻害薬である U0126 (5 µg) を RvD1 あるいは RvD2 と同時に i.c.v. 投与したところ、RvD1 及び RvD2 の抗うつ作用は有意に抑制された (図 3A)。また、いずれの薬物

も自発運動量には有意な影響を及ぼさなかった (図 3B)。この結果から、ERK の活性化が RvD1 及び RvD2 の抗うつ作用に関与していることが明らかとなった。

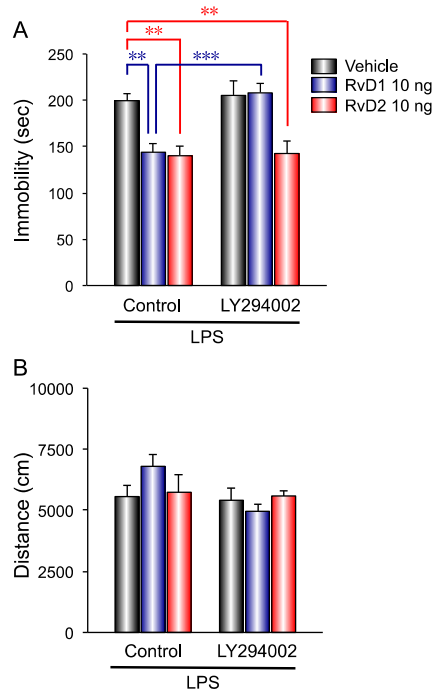


図 2 RvD1 及び RvD2 の抗うつ作用に対する PI3 キナーゼ阻害薬 LY294002 同時投与の効果 (A)尾懸垂試験における無動時間、(B) オープンフィールド試験における総移動距離。  
\*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001

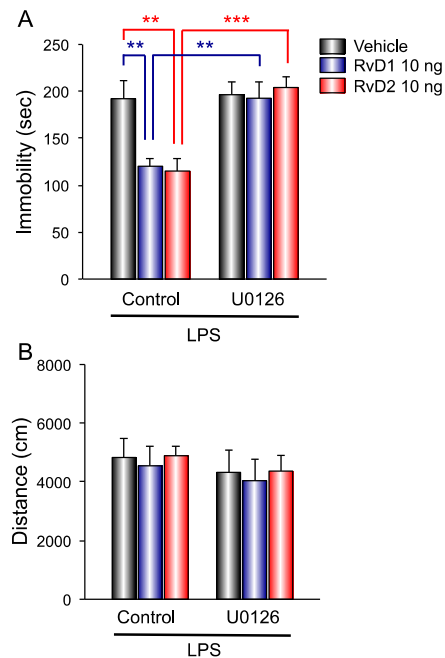


図 3 RvD1 及び RvD2 の抗うつ作用に対する MEK 阻害薬 U0126 同時投与の効果 (A)尾懸垂試験における無動時間、(B) オープンフィールド試験における総移動距離。  
\*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001

PI3 キナーゼは、Akt を介して mTOR を活性化する。また、ERK も mTOR 活性化に関与する。そこで、RvD1 及び RvD2 の抗うつ作用における mTOR の関与について検討を行った。RvD1 あるいは RvD2 i.c.v. 投与の 30 分前に mTOR 阻害薬 Rapamycin (10 mg/kg) を i.p. 投与したところ、RvD1 及び RvD2 の抗うつ作用は有意に抑制された (図 4A)。また、いずれの薬物も自発運動量には有意な影響を及ぼさなかった。この結果から、mTOR 活性化が RvD1 及び RvD2 の抗うつ作用に関与していることが明らかとなった。

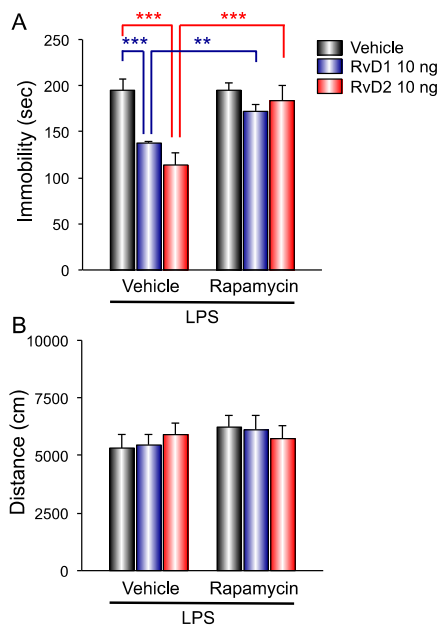


図 4 RvD1 及び RvD2 の抗うつ作用に対する mTOR 阻害薬 Rapamycin 前投与の効果 (A) 尾懸垂試験における無動時間、(B) オープンフィールド試験における総移動距離。  
\*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001

本研究において、炎症によるうつ病発症を模倣した LPS 誘発うつ病モデルにおいて、RvD1 及び RvD2 が抗うつ作用を示すことが明らかとなった。また、RvD1 の抗うつ作用には PI3 キナーゼ・ERK/mTOR 経路の活性化が重要であること、並びに、RvD2 の抗うつ作用には ERK・mTOR 経路の活性化は重要であるが、PI3 キナーゼは関与しておらず RvD1 とは一部作用メカニズムが異なることを見出した。今後、RvD1 及び RvD2 が、慢性疼痛モデル動物の抑うつ症状にも有効であるかについて更に検討を行う必要はあるが、本研究成果は、強力な鎮痛作用を有することが報告されている RvD1 及び RvD2 が抗うつ作用をも有しており、「身体」と「心」の両方を苦痛から解放できる新たな疼痛治療薬となる可能性を示唆するものである。

## 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 0 件)  
なし

〔学会発表〕(計 9 件)

霜田健斗、出山諭司、井手聡一郎、福田隼、周東智、南雅文  
レゾルピン E2 の抗うつ作用に関する検討  
日本薬学会第 135 年会  
2015 年 3 月 25-28 日  
デザイン・クリエイティブセンター神戸  
(兵庫県・神戸市)

吉川琴美、出山諭司、霜田健斗、石川由香、井手聡一郎、南雅文  
レゾルピン D1 および D2 の抗うつ作用メカニズム  
第 24 回日本臨床精神神経薬理学会・第 44 回日本神経精神薬理学会合同年会  
2014 年 11 月 20-22 日  
名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

吉川琴美、出山諭司、霜田健斗、井手聡一郎、南雅文  
レゾルピン D1 及び D2 の抗うつ作用に関する検討  
第 65 回日本薬理学会北部会  
2014 年 9 月 26-27 日  
コラッセふくしま (福島県・福島市)

石川由香、出山諭司、吉川琴美、霜田健斗、南雅文  
レゾルピン D1 の抗うつ作用メカニズムに関する検討  
第 28 回北海道薬物作用談話会  
2014 年 7 月 19 日  
北海道大学大学院獣医学研究科・新講義棟講堂 (北海道・札幌市)

Deyama S, Ide S, Ohno A, Tamano R, Koseki K, Naka T, Maruyama C, Yoshioka M, Minami M  
Opposing roles of corticotropin-releasing factor and neuropeptide Y within the dorsolateral bed nucleus of the stria terminalis in the negative affective component of pain in rats.  
Society for Neuroscience 43rd Annual Meeting  
2013 年 11 月 9-13 日  
San Diego Convention Center (San Diego, USA)

出山諭司、吉川琴美、霜田健斗、南雅文  
リポポリサッカライド誘発うつ病様行動に対するレゾルピン D シリーズの効果  
第 23 回日本臨床精神神経薬理学会・第 43

回日本神経精神薬理学会合同年会

2013年10月24-26日

沖縄コンベンションセンター(沖縄県・宜野湾市)

霜田健斗、出山諭司、吉川琴美、南雅文  
LPS 誘発うつ病モデルマウスを用いたレゾルピン D1, D2 の抗うつ作用に関する検討

第27回北海道薬物作用談話会

2013年7月20日

酪農学園大学(北海道・江別市)

出山諭司、中誠則、井手聡一郎、仲子友和、平田美紀枝、眞嶋悠幾、武田宏司、吉岡充弘、南雅文

腹側分界条床核内 アドレナリン受容体の活性化は摂食量減少と不安様行動を惹起する

第36回日本神経科学大会・第56回日本神経化学会大会・第23回日本神経回路学会大会合同大会

2013年6月20-23日

京都国際会館(京都府・京都市)

吉川琴美、出山諭司、霜田健斗、南雅文  
LPS 誘発うつ病モデルマウスを用いたレゾルピン D2 の抗うつ作用に関する検討

日本薬学会北海道支部第140回例会

2013年5月18日

札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

出山 諭司 (DEYAMA, Satoshi)

北海道大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：30634993

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし