

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860383

研究課題名(和文) 脂質メディエーターによる急性疼痛から慢性疼痛移行過程における制御機構解明と創薬

研究課題名(英文) Differential regulation of lipid mediators in acute and chronic pain and drug discovery

研究代表者

永井 潤 (NAGAI, Jun)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・助教

研究者番号：20608369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：LPAは、神経障害性疼痛の初発因子として同定された脂質メディエーターである。一方、AEAや2-AGに代表されるエンドカンナビノイドは、知覚神経において逆行性シグナルとして、疼痛刺激を抑制している。本研究では、LPAとカンナビノイド系の相互抑制機構を検証する中で、LPAがカンナビノイドの分解酵素の発現上昇を誘発し、エンドカンナビノイドの産生量を減少させることを明らかにした。さらに、このLPAとカンナビノイドの相互抑制機構は、神経障害性疼痛時と炎症性疼痛時には異なる制御機構を形成していた。以上の結果は、急性疼痛と慢性疼痛のメカニズムの機構解明と創薬研究にとって重要な成果となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Lysophosphatidic acid (LPA) signaling initiates the molecular machineries of neuropathic pain. At the level of spinal cord, LPA also plays key roles in the amplification of initial pain signals and possibly in the maintenance of pain. On the other hand, endocannabinoids (ECs) such as anandamide or 2-arachidonoylglycerol (2-AG) are known to play roles in the suppression of inflammatory or nociceptive pain signal through CB1 receptor on primary afferent sensory fibers as another type of reverse signals. In this study, we discovered that LPA increased the gene expression of the degradation of ECs and the decreased the ECs level. This counter-balancing cross-talk system between LPA and ECs is differently regulated in the neuropathic and inflammatory pain. These results are important for understanding of the machinery between acute and chronic pain and drug discovery.

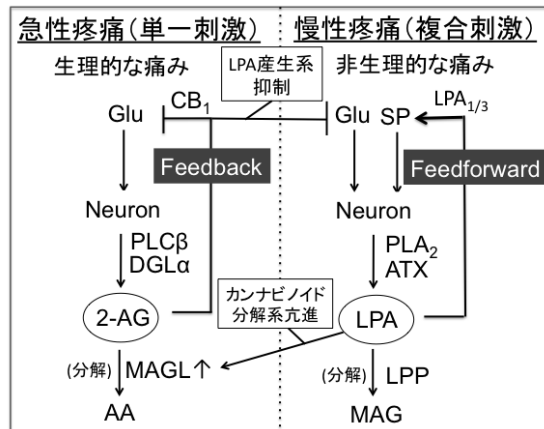
研究分野：薬理学

キーワード：リゾホスファチジン酸 カンナビノイド LC-MS/MS 神経障害性疼痛 炎症性疼痛 2-AG CB受容体相互作用

1. 研究開始当初の背景

(1) カンナビノイド類やプロスタグランジン類などの脂質メディエーターは痛みの制御因子として古くからよく知られている。神経機能上のこれらの脂質メディエーターの特徴は、細胞膜のリン脂質から産生されること、細胞膜から遊離し、オートクラインあるいはパラクライン的に作用する、神経活動の活性化によって要時産生されるということである。急性疼痛時には、単一刺激による神経興奮に伴って疼痛が伝達されるが、エンドカンナビノイドである 2-AG が同時に逆行性シグナルとして CB₁ 受容体に作用してグルタミン酸などの疼痛伝達物質を抑制的に働くことが知られている (*J Am Osteopath Assoc.* 2008.Review)

(図 1.急性疼痛:2-AG による痛みのフィードバック)



一方、申請者は、慢性疼痛の原因分子としてのリゾホスファチジン酸 (LPA) の合成機構とその病態機能 (脱髄・疼痛関連遺伝子の発現上昇) を明らかにしてきた (*Mol Pain* 2011,2013, *JNC* 2011, *BBA*.2013,Review)。LPA は、他の脂質メディエーターと異なり急性疼痛時には産生されず、神経障害などの病態時特異的に非生理的 (複合的) な疼痛刺激をもって産生されること、自己増幅系を介して疼痛を増強していること明らかにしてきた (図 1.慢性疼痛:LPA による痛みのフィードフォワード)。

しかしながら、同じ脊髄レベルにおいても、神経障害性疼痛を誘発する LPA 産生系と相反する鎮痛作用を有するカンナビノイド系との関連性は不明のままである。

最近の申請者らの結果では、カンナビノイドが神経障害時の LPA 合成系を抑制することを見出しており、一方 LPA はカンナビノイド系を抑制することが報告されている (*PLOS ONE*, 2012)。これらの結果は、急性疼痛時にはエンドカンナビノイドは、LPA 産生を抑制しているが、慢性疼痛時において、一旦 LPA が産生されると LPA はエンドカン

ナビノイド系を抑制し、申請者らが明らかにしてきた LPA フィードフォワード機構を増強していることが推測される。すなわち、エンドカンナビノイドと LPA の相互抑制機構が急性疼痛から慢性疼痛への移行を制御していることが推測される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、神経障害性疼痛と炎症性疼痛モデルを用いて、LPA とカンナビノイド系の相互抑制作用について、脂質メタボロミクス解析を行い、脂質関連分子群の発現変動とその制御機構の解明し、急性疼痛から慢性疼痛移行過程における制御機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 神経障害性疼痛モデルの作製

麻酔下のマウスの片側後肢部分の皮膚を開き、露出させた坐骨神経の半分を縫合針で通してすくいあげ、縫合糸で完全に結紮し、切開部分を縫合する。

(2) 炎症性疼痛モデル

マウスに ADJUVANT COMPLETE FREUND あるいはカラゲニンを使用直前十分転倒混和した後、足蹠に皮下投与した。対照群としては同量の生理食塩水を足蹠皮下投与した。

(3) 疼痛試験評価方法

使用するマウスは、実験の 1-2 時間前から透明ガラス板上に置き上から透明ケージをかぶせて実験環境に慣れさせてから実験を行った。測定には Thermal stimulator を用い、マウスの右後肢足蹠に対して一定の熱刺激を加えた時に逃避反応を示すまでの潜時時間 (sec) を閾値 (PWL; Paw withdrawal Latency) として評価する。

(4) LC-MS/MS を用いた LPA/2AG 定量法

マウス脊髄組織にメタノールまたはアセトニトリルを加え、超音波破碎し、遠心を繰り返し後、上清を回収し、Duo-filter を通過させ、抽出サンプルとする。液体クロマトグラフィー (LC) については、適切な水相と有機相を用いる。さらに MS/MS 分析を行い、LPA または 2-AG 特異的な分子を同定し、定量解析を行う。

(5) リアルタイム PCR 法

マウス脊髄組織あるいは DRG を TRIzol 試薬中でホモジナイズし、Total RNA の抽出を行う。SuperScriptIII reverse transcriptase を用いて逆転写反応を行い、cDNA を作製する。リアルタイム PCR 反応には、GeneAce SYBR qPCR Mix を使用して行う。

4. 研究成果

1) 神経障害/炎症性疼痛における脂質代謝

1-1) 神経障害性疼痛モデルを作成し、神経障害後の脊髄の LPA を定量したところ、神経障害 3-6 時間後をピークに LPA 産生は上昇していた。特に 18:1-LPA が他の分子種に比べて存在比率が高く、次に 16:0-LPA、18:0-LPA の分子種が多く、神経障害により増加した。一方、代表的な炎症性疼痛モデルとして、CFA (Complete Freund's adjuvant) 投与後、脊髄 LPA 量を定量したが、1 時間語から 24 時間後まで変化はなかった。

1-2) 代表的なカンナビノイドとして、2-アラキドノイルグリセロール(2-AG)が知られており、逆行性シグナルとして CB₁ 受容体に作用してグルタミン酸などの疼痛伝達物質を抑制的に働くことが知られている。本研究では、LC-MS/MS を用いて脊髄から 2AG の定量法を確立した。脊髄組織をアセトニトリルあるいはメタノールを用いて、超音波破砕を行う。その後、内標準物質として、一定量の d8-2AG を加え脂質抽出を行った。LC-MS/MS を用いることにより、2-AG 分子を同定した形で定量解析が可能となった

1-3) 上記で確立した 2-AG の定量法を用いて、神経障害後の脊髄の 2-AG を定量したところ、神経障害 1 時間後をピークに 2-AG 産生は上昇する傾向にあったが、その後 2-AG 量は低下した。一方、CFA 投与による炎症性疼痛モデルにおいては、3 時間後をピークに上昇する傾向が観察された。

1-4) 上記の結果は、炎症性疼痛時には、脊髄で上昇する 2-AG などのカンナビノイド合成が促進し、LPA 産生を抑制している可能性が示唆された。一方、神経障害性疼痛時には、2-AG は上昇するものの、一旦脊髄で LPA が産生されると、このカンナビノイド合成を抑制する相互抑制機構の可能性が示唆された。

2) 炎症性疼痛におけるカンナビノイド受容体の役割

2-1) 炎症性疼痛における疼痛閾値の変化を測定するために、代表的な炎症性疼痛モデルとして、カラゲニン投与後のマウスの疼痛閾値を観察した。本モデルは、CFA モデルより、短期間でその疼痛閾値低下が回復するところまで観察できる。本モデルを用いて、WT マウスにカラゲニンを投与して、疼痛閾値を観察したところ、カラゲニン投与後 4 時間後をピークに閾値の低下が観察された。

2-2) 炎症性疼痛におけるカンナビノイド受容体の役割を観察するために、CB₁ の siRNA を *in vivo* JetSI (0.5 µg/5 µl) を処置し、その 2 日後にカラゲニンを投与した。Control siRNA 処置群では、4 時間後をピークに疼痛

過敏を誘発し、その後回復するものの、CB₁ の siRNA を処置したマウスは、その疼痛過敏が 24 時間後まで延長することが明らかとなった。

2-3) 上記と同様に CB₂ の siRNA を処置したマウスにおいても、その疼痛過敏が 24 時間後まで延長することが明らかとなった。

2-4) 以上の結果は、炎症性疼痛時には、エンドカンナビノイドの増加が認められるが、CB₁ あるいは CB₂ 受容体を抑制すること (エンドカンナビノイド系の Loss of function) により炎症性疼痛が増強することが明らかとなった。

3) リゾホスファチジン酸(LPA)によるエンドカンナビノイド分解酵素の発現上昇

3-1) LPA とカンナビノイドの相互抑制機構のメカニズムについては、LPA によるカンナビノイド分解酵素の遺伝子発現の変調機構を解析することで検証した。これまでに他のグループによって、子宮片では LPA によって主要なカンナビノイド酵素の一つである FAAH (Fatty acid amide hydrolase) の発現が上昇することが報告されている (PLOS ONE 7,9,2012)。DRG において、LPA の脊髄クモ膜下腔内投与 6 時間後において、が 1-10nmol の範囲で用量依存的に上昇することが明らかとなった。また、LPA の脊髄クモ膜下腔内投与は、DRG において 2-AG の分解酵素である MAGL の遺伝子発現を上昇する傾向にあり、LPA 投与後の 2-AG 量は、LC-MS/MS 測定により減少する傾向にあった。

3-2) DRG のみならず神経障害性疼痛モデルにおける脊髄の FAAH と MAGL の遺伝子発現を定量したところ、6 時間後をピークに上昇していた。

3-3) *in vitro* 系において、神経細胞株である SH-SY5y に LPA (50 マイクロ M) を添加 (6 時間後) したときに、MAGL と FAAH の両者が上昇していた。

以上のことから、炎症性疼痛時には神経で 2AG などのカンナビノイドが産生され、ネガティブフィードバック機構を介して、痛みを抑制しており、また過剰な痛み刺激が入らないように、すなわち LPA の産生を抑制している可能性が示唆された。一方、神経障害性疼痛時には、LPA はエンドカンナビノイドの分解系を亢進させ、エンドカンナビノイド系を抑制することにより、自身の産生を増強していると考えられる。この両者の相互抑制機構は、神経障害性疼痛と炎症性疼痛の分子メカニズムの違いを理解するうえで重要な手がかりになることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Olaposi O1, Nagai J, Ueda H,;
Lys39-Lysophosphatidate Carbonyl Oxygen
Interaction Locks LPA1 N-terminal Cap to
the Orthosteric Site and partners Arg124
During Receptor Activation
Scientific Report 13;5:13343, 2015
Doi: 10.1038/srep13343.
(査読有)

Uchida H*, Nagai J* (*Equal contributed),
Ueda H;
Lysophosphatidic acid and its receptors
LPA1 and LPA3 mediate paclitaxel-induced
neuropathic pain in mice.
Mol Pain 17(9), 1, 2014.
Doi: 10.1186/1744-8069-10-71.
(査読有)

〔学会発表〕(計 6 件)

永井潤、迎武紘、植田弘師
Interaction between lysophosphatidic acid
and endocannabinoid system in
inflammatory and neuropathic pain
FASEB SCIENCE RESEARCH CONFERENCE、2015
年 8 月 2 3 日、Banff Canada

永井潤、杉浦悠毅、植田弘師
質量顕微鏡と LC-MS/MS 解析による神経障害
時の脊髄におけるリゾホスファチジン酸合
成機構の解析
第 37 回日本疼痛学会、2015 年 07 月 04 日、
市民会館、熊本

永井潤、迎武紘、植田弘師
Interaction between lysophosphatidic acid
and endocannabinoid system in
inflammatory and neuropathic pain
第 88 回 日本薬理学会年会、2015 年 03 月
18 日、名古屋国際会議場、愛知

永井潤、迎武紘、植田弘師
Molecular machineries determining the
levels of LPA production in various
neuropathic pain models- LC-MS/MS
analysis
6th international conference on
Phospholipase A2 and Lipid Mediators、2015
年 02 月 10 日、京王プラザホテル、東京

永井潤、早田信正、河野浩之、迎武紘、植
田弘師
パクリタキセル誘発性神経障害性疼痛にお
ける LPA 合成と脱随機構
第 3 6 回 日本疼痛学会、2014 年 06 月 20 日、
KKR ホテル大阪、大阪

植田弘師、永井潤
慢性疼痛病態時のリゾホスファチジン酸整

合性のフィードフォワード合成機構
第 5 6 回 日本脂質生化学会、招待講演、2014
年 06 月 07 日、近畿大学東福岡キャンパス、
大阪

〔図書〕(計 1 件)

植田弘師、永井潤
痛み診療キーポイント
文光堂、2014、p36-37

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/soyaku/index-j.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

永井潤 (NAGAI, Jun)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)
・助教

研究者番号：20608369