

神戸学院大学大学院薬学研究科学位論文

反復ストレス暴露による
慢性疼痛形成機構における
脳内脂肪酸—GPR40/FFAR1 の関与

2019 年 1 月

相 澤 風 花

目 次

略語一覧

序 論	1
-----------	---

本 論

第一章 GPR40/FFAR1 欠損マウスにおける各種情動行動の解析

1-1. 緒 言	3
----------------	---

1-2. 実験材料および方法	4
----------------------	---

1-2-1. 実験動物

1-2-2. 行動解析スケジュール

1-2-3. 高架式十字迷路試験

1-2-4. オープンフィールド試験

1-2-5. 社会性相互作用試験

1-2-6. スクロース嗜好性試験

1-2-7. 脳組織からのモノアミン抽出および LC-MS/MS

1-2-8. 統計学的処理

1-3. 結 果	7
----------------	---

1-3-1. GPR40/FFAR1 の欠損が不安様行動に及ぼす影響

1-3-2. GPR40/FFAR1 の欠損が抑うつ様行動に及ぼす影響

1-3-3. GPR40/FFAR1 の欠損が社会性行動に及ぼす影響

1-3-4. Serotonin、noradrenalin および dopamine 量に対する GPR40/FFAR1 欠損の影響

1-4. 考 察	12
----------------	----

第二章 脳内の脂肪酸環境調節因子としてのアストロサイトの機能解析

2-1. 緒 言	15
----------------	----

2-2. 実験材料および方法	16
----------------------	----

2-2-1.	実験動物	
2-2-2.	ラット大脳皮質由来初代培養アストロサイトの作製	
2-2-3.	LPS 処置および細胞生存率の評価	
2-2-4.	蛍光免疫組織染色および形態評価	
2-2-5.	ラット大脳皮質由来アストロサイト抽出液および細胞培養液の調製ならびに LC-MS/MS 用サンプルの調製	
2-2-6.	ラット大脳皮質由来アストロサイト RNA 抽出液の調製および real-time PCR	
2-2-7.	統計学的処理	
2-3.	結 果	19
2-3-1.	LPS 処置 24 時間後の初代培養アストロサイトにおける細胞毒性評価および形態変化	
2-3-2.	LPS 処置 24 時間後の初代培養アストロサイトにおける遊離脂肪酸量の解析	
2-3-3.	LPS 処置 24 時間後の初代培養アストロサイト培養液における遊離脂肪酸量の解析	
2-3-4.	LPS 処置 24 時間後の初代培養アストロサイトにおける cPLA ₂ および iPLA ₂ mRNA 発現変化	
2-4.	考 察	23
第三章 ストレス誘導性慢性疼痛形成時における脳内リン脂質の解析		
3-1.	緒 言	26
3-2.	実験材料および方法	27
3-2-1.	実験動物	
3-2-2.	実験および行動試験スケジュール	
3-2-3.	社会的敗北ストレス (SDS) における Resident マウスの作製	
3-2-4.	SDS	
3-2-5.	社会性相互作用試験	
3-2-6.	オープンフィールド試験	
3-2-7.	高架式十字迷路試験	
3-2-8.	術後痛モデルの作製	

3-3-9.	von Frey 試験	
3-3-10.	MALDI-IMS 用脳組織切片作製および MALDI-IMS	
3-3-11.	薬物および投与スケジュール	
3-3-12.	統計学的処理	
3-3.	結 果	31
3-3-1.	RSDS 暴露が体重および社会性行動に及ぼす影響	
3-3-2.	RSDS 暴露が不安様行動に及ぼす影響	
3-3-3.	RSDS 暴露が術後痛処置によって生じる機械的痛覚過敏に及ぼす影響	
3-3-4.	慢性疼痛形成期における脳内リン脂質の局在解析	
3-3-5.	DHA 反復投与が RSDS 暴露後の不安様行動および RSDS 誘導性慢性疼痛形成に及ぼす影響	
3-4.	考 察	40
第四章 ストレス誘導性慢性疼痛形成機序における DHA—GPR40/FFAR1 シグナル機構の関与		
4-1.	緒 言	43
4-2.	実験材料および方法	44
4-2-1.	食餌誘導性 n-3 系脂肪酸欠乏マウスの作製	
4-2-2.	遊離脂肪酸量測定	
4-2-3.	実験スケジュール	
4-2-4.	von Frey 試験	
4-2-5.	RSDS 暴露モデルマウスにおける osmotic mini-pump の移植	
4-2-6.	統計学的処理	
4-3.	結 果	48
4-3-1.	食餌誘導性 n-3 系脂肪酸欠乏マウスにおける脳内脂肪酸組成解析および RSDS 暴露期間における体重変化	
4-3-2.	RSDS 暴露が食餌誘導性 n-3 系脂肪酸欠乏マウスにおける不安様行動に及ぼす影響	
4-3-3.	RSDS 暴露が食餌誘導性 n-3 系脂肪酸欠乏マウスにおける機械的痛覚過敏に及ぼす影響	

4-3-4.	DHA の反復投与が n-3 系脂肪酸欠乏マウスにおける RSDS 誘導性不安様行動に及ぼす影響	
4-3-5.	DHA の反復投与が n-3 系脂肪酸欠乏マウスにおける RSDS 誘導性慢性疼痛に及ぼす影響	
4-3-6.	脳内 GPR40/FFAR1 シグナルの阻害が RSDS 暴露後の社会性行動に及ぼす影響	
4-3-7.	脳内 GPR40/FFAR1 シグナルの阻害が RSDS 暴露後の不安様行動に及ぼす影響	
4-3-8.	RSDS 暴露に伴う脳内 GPR40/FFAR1 シグナルの阻害が術後痛処置によって生じる機械的痛覚過敏に及ぼす影響	
4-4.	考 察	61
	総 括	64
	謝 辞	66
	引用文献	68

略語一覽

ANOVA	analysis of variance
ATP	adenosine triphosphate
BSA	bovine serum albumin
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
cPLA ₂	cytosolic phospholipase A ₂
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DBH	2,5-dihydroxybenzoic acid
DHA	docosahexaenoic acid
DMSO	dimethyl sulfoxide
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EPA	eicosapentaenoic acid
EPM	elevated plus-maze
FBS	fetal bovine serum
fMRI	functional magnetic resonance imaging
GABA	gamma-aminobutyric acid
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GPR40/FFAR1	G-protein coupled receptor 40/free fatty acid receptor 1
HPLC	high performance liquid chromatography
iPLA ₂	calcium-independent phospholipase A ₂
KO	knockout
LC-MS/MS	liquid chromatography / mass spectrometry
LPS	lipopolysaccharide
MALDI-IMS	matrix assisted laser desorption/ionization-imaging mass spectrometry
mRNA	messenger ribonucleic acid
MRM	multireaction monitoring
OF	open field
PBS	phosphate buffered saline
PC	Phosphatidylcholine

PCR	polymerase chain reaction
PSNL	partial sciatic nerve ligation
PWT	paw withdrawal threshold
RNA	ribonucleic acid
RSDS	repeated-social defeat stress
S.E.M.	standard error of the mean
SDS	social defeat stress
SI	social interaction
SP	sucrose preference
TOF	time of flight
vF	von Frey
WT	wild type

序 論

痛みは、組織の障害に伴って生じる感覚、および情動体験と定義され、その持続期間によって急性および慢性に分類される¹⁾。急性痛は、組織障害に伴って生じる痛みであり、組織の治癒と共に痛みが消失することから生体の防御システムとしての機能を果たす。一方、慢性疼痛は治癒に必要な期間を超えて持続する痛みを指し、急性痛が有する生体防御機能の破綻が生じる他、生体に有害な影響を与える²⁾。世界保健機関が作成する **International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems** の第 11 改訂版において、慢性疼痛は、神経障害性疼痛や筋骨格痛などを含め 7 つに細分化されるなど、「疾患」としての認知度が高まっている³⁾。

本邦では、矢吹らによる大規模調査から、成人人口の約 20%、即ち 5 人に 1 人は慢性疼痛を抱えているとの報告がある⁴⁾。慢性疼痛に対する薬物療法は多岐にわたり、現在では非ステロイド性消炎鎮痛薬やオピオイドなどの鎮痛薬のみならず、抗てんかん薬や抗うつ薬など、その他疾患の治療薬も使用されている⁵⁾。特に、抗うつ薬として使用される選択的ノルアドレナリン・セロトニン再取り込み阻害剤であるデュロキセチンは 2012 年に糖尿病性神経障害に伴う疼痛、線維筋痛症に伴う疼痛、2016 年には慢性腰痛症に伴う疼痛に適応が拡大されている。しかしながら、これら薬物を含めた既存の治療によって効果が得られていると感じている慢性疼痛患者は僅か 3 割ほどにとどまり、残りの 7 割は満足な治療が施されていない⁶⁾。その原因として、組織損傷などの器質的要因のみならず、痛みの持続に伴う不安などの精神的ストレスや、治療の長期化に伴う経済的負担の増加などの種々の非器質的要因が病態を複雑化・難治化させていることがあげられる⁷⁻⁹⁾。中でも不安障害やうつ病は、慢性疼痛患者の約 35-40% が合併すると報告されている。疼痛保有者における不安や抑うつ症状の合併は、治療に対する意欲を低下させる¹⁰⁾。また、痛みそのものの重症度や慢性化にも関連していることも報告されている¹¹⁾。情動機能が関連した痛みの慢性化メカニズムとしては、情動機能制御を担う脳領域の萎縮や痛みを上行性に伝える脊髄神経系の過剰興奮の可能性が示唆されている^{12,13)}。しかしながら、その詳細は未だ不明な点が多く、特定の治療標的探索にも時間を要している。

古くから脂質、特に n-3 系脂肪酸の摂取は、心血管疾患のリスク軽減や認知機能の改善作用などが報告されている^{14,15)}。近年では、うつ病や炎症性疼痛、神経障害性疼痛においても n-3 系脂肪酸による軽減効果が示されている^{16,17)}。実際に、うつ病や慢性疼痛を有する患者では、血清中の n-3 系脂肪酸が減少していることが明らかとなっている¹⁸⁾。n-3 系脂肪酸の摂取がもたらす種々の改善作用は、n-3 系脂肪酸の代謝産物による抗炎症作用や抗酸化作用に関連すると考えられていた¹⁹⁾。しかしながら近年では、脂肪酸受容体ファミリーが同定され、種々の疾患に対する脂肪酸シグナルの研究が注目を集めている。

脂肪酸受容体ファミリーのうち、炭素側鎖が 12 を超える中一長鎖脂肪酸をリガンドとする G-protein coupled receptor 40/free fatty acid receptor 1 (GPR40/FFAR1) は、げっ歯類およ

びヒトの脳・膵臓に豊富に発現することが見出されている²⁰⁻²²⁾。膵臓に発現する GPR40/FFAR1 は、脂肪酸センサーとして機能し、 β -細胞から血糖依存的にインスリンを分泌することから、2 型糖尿病の治療標的として注目されている^{23,24)}。一方、脳において、GPR40/FFAR1 は視床下部弓状核に存在する内因性オピオイドペプチド β -endorphin 含有細胞、中脳の青斑核に存在する dopamine β -hydroxylase 含有細胞、および延髄の縫線核に存在する tryptophan hydroxylase 含有細胞に発現していることが示されている^{25,26)}。これらの神経系は GPR40/FFAR1 によって活性化されることで内因性の疼痛制御機構を賦活化することから、疼痛治療の新たな標的となることが見出されている²⁶⁾。また、GPR40/FFAR1 の発現が認められた dopamine β -hydroxylase 含有細胞および tryptophan hydroxylase 含有細胞は、それぞれモノアミンである noradrenaline および serotonin の放出能を有している。うつ病や不安障害を合併する患者においては、脳内における noradrenalin および serotonin 放出が減少しており、神経終末におけるこれらモノアミンの再取り込みを阻害すると、症状が改善されることが知られている。しかしながら、GPR40/FFAR1 シグナルの情動機能制御への関与、また GPR40/FFAR1 シグナルの機能不全が不安や抑うつ症状を合併した際に生じる痛みの慢性化に関与するかは不明であった。そこで本研究では、痛みの慢性化における情動機能の役割およびそのメカニズムの解明を目的に、脳内の脂肪酸および GPR40/FFAR1 の関与について検討した。

本 論

第一章

GPR40/FFAR1 欠損マウスにおける各種情動行動の解析

1-1. 緒 言

脂肪酸は、リン脂質やトリグリセリド、エイコサノイドなど多岐にわたる形態をとることで、細胞の構造維持、エネルギー産生、シグナル伝達といった生体の恒常性維持に関与する²⁷⁾。脳は、脂質が豊富な組織であり、脂質の機能破綻はアルツハイマー病や統合失調症などの中枢性疾患の発症と関連している^{28,29)}。Hibbeln は世界各国における大うつ病の罹患率と魚の摂取量の関係性について報告している³⁰⁾。この報告は、魚の摂取量が多い国ほど大うつ病の罹患率が低いことを示唆しており、その要因として、魚に多く含まれる n-3 系脂肪酸が大うつ病を抑制する可能性を指摘している。近年の臨床報告では、n-3 系脂肪酸の中でも、脳内に豊富に存在する docosahexaenoic acid (DHA) の減少が大うつ病や不安障害の罹患率と相関していることが明らかとされている^{16,31)}。我々もこれまでに、強制水泳ストレスに暴露したマウスの海馬では DHA が減少することを見出している³²⁾。さらに、強制水泳試験において抑うつ様行動の指標となるマウスの無動時間の延長は、GPR40/FFAR1 作動薬の GW9508 を側脳室内へ連日投与することによって改善したことから、うつ病などの情動機能異常の発現には、脳内の脂肪酸—GPR40/FFAR1 シグナルの機能低下が関与していることが考えられる。マウス脳において、GPR40/FFAR1 は視床下部の神経細胞に豊富に発現しているが、それ以外にも中脳や延髄、海馬などの神経にも見出されている^{25,33)}。うつ病や不安障害は、青斑核を起始核とする noradrenalin 作動性神経や大縫線核を起始核とする serotonin 作動性神経といったモノアミン神経系の機能低下や海馬における神経新生能の低下が関連している³⁴⁻³⁶⁾。これらの報告は、脳内における GPR40/FFAR1 シグナル伝達能の低下が情動機能破綻を誘導する可能性を示しているが、確定するに至っていなかった。そこで、GPR40/FFAR1 の欠損マウスを作製し、各種行動試験を用いて、GPR40/FFAR シグナルの欠損が情動機能に与える影響について解析した。

本章の研究内容の一部は、下記の論文として公表した。

1. Aizawa F, Nishinaka T, Yamashita T, Nakamoto K, Kurihara T, Hirasawa A, Kasuya F, Miyata A, Tokuyama S. GPR40/FFAR1 deficient mice increase noradrenaline levels in the brain and exhibit abnormal behavior. *J. Pharmacol. Sci.*, **132**, 249-254 (2016)

1-2. 実験材料および方法

1-2-1. 実験動物

C57BL/6J 系統マウス (雄性、7-8 週齢) は、日本 SLC 株式会社 (静岡、日本) から購入した。GPR40/FFAR1 欠損 (GPR40^{KO}) マウスは、京都大学大学院 薬学研究科 医薬創成情報科学専攻医薬創成情報科学講座 平澤 明 准教授より分与いただいた。Ffar1 遺伝子上の exon 1 領域を PGK-neo 耐性遺伝子に置換し、胚へ導入した。導入した胚は、ICR 系統の偽妊娠雌性マウスへ経卵管壁卵管内胚移植法によって移植し、出産・哺育させた。得られた GPR40^{KO} マウスを交配させ、出生後遺伝子型を確認し実験に用いた。マウスは個別にハンドリングを行った後、温度 24°C、湿度 55 ± 5% の環境下において明暗サイクルが 12 時間 (AM 8:00 点灯、PM 8:00 消灯) の室内にて 4-5 匹/ケージとなるように群飼育した。なお、固形飼料 (オリエンタル酵母、東京、日本) および水は、自由に摂取させた。全ての実験は、日本薬理学会が策定する動物実験に関する指針に従い、また、神戸学院大学動物委員会の承認を得て行った (承認番号: A16-23)。

1-2-2. 行動解析スケジュール

各種行動解析は、Fig. 1 のスケジュールに従って行った。9-10 週齢の GPR40/FFAR1 野生型 (WT) および GPR40^{KO} マウスにおける情動評価には、高架式十字迷路試験、オープンフィールド試験、社会性相互作用試験、およびスクロース嗜好性試験を用いた。各種行動試験は 1 日 1 試験の条件で明期 (AM 10:00-PM 3:00) に行った。

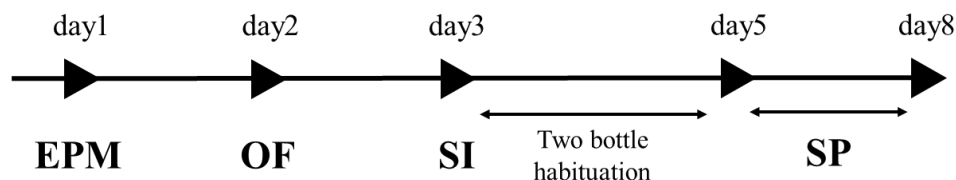


Fig. 1. Experimental schedule for behavioral analysis.

EPM, elevated plus-maze test; OF, open field test; SI, social interaction test; SP, sucrose preference test.

1-2-3. 高架式十字迷路試験

高架式十字迷路試験は、不安様行動の評価に用いた。高架式十字迷路は、壁のある 2 本の enclosed arm と壁のない 2 本の open arm、その中央に設けられた plat form によって構成される。本十字迷路を床から高さ 50 cm に設置し、4 本の arm の先端が同程度の照度となるように、plat form の照度を 330 lux に設定した。マウスを plat form におき、十字迷路内を 5 分間自由に探索させ、各 enclosed arm および open arm への侵入回数および滞在時間を測定した。行動の測定および解析法は、十字迷路上部に設置したビデオカメラにて記録し、video tracking system (ANY-maze; ブレインサイエンス・イデア株式会社、東京、日本)

を用いて解析した。不安様行動は、4 本の arm の合計滞在時間に対する open arm の滞在率を算出し評価した。十字迷路は、各測定終了時に水で清拭し、十分に乾燥させた。

1-2-4. オープンフィールド試験

オープンフィールド試験は、自発運動量および不安様行動の評価に用いた。オープンフィールド (縦×横×高 = 45 × 45 × 35 cm) の中央にセンター領域 (27 × 27 cm) を設け、6 ± 2 lux となるように照度を設定した。マウスをオープンフィールドに置き、5 分間自由に探索させた。自発運動量は試験時間中の総移動距離、不安様行動は試験時間に対するセンター領域への滞在率を算出し評価した。各測定終了時にオープンフィールドは水で清拭し、十分に乾燥させた。行動の測定および解析法は、高架式十字迷路試験と同様に行った。

1-2-5. 社会性相互作用試験

社会性相互作用試験は、社会性行動の評価に用いた。社会的相互作用試験は Berton らの報告をもとに行った³⁷⁾。本試験は no target および target の 2 つの試験から構成される。オープンフィールド (縦×横×高 = 45 × 45 × 35 cm) の一端に interaction 領域、その反対側の両端に corner 領域を設け、フィールドが照度 6 ± 2 lux となるように設定した。Interaction 領域に透明で小孔のある箱を置き、オープンフィールドにマウスを入れ 2.5 分間自由に探索させた (no target)。マウスを飼育ケージへ戻した後、interaction 領域に置いた箱の中に、系統・性別・週齢が同じマウスを入れた。マウスを再度オープンフィールドへ戻し、同様に探索させた (target)。No target および target における総移動距離、interaction 領域および corner 領域における滞在時間を測定した。行動の測定および解析は高架式十字迷路試験と同様に行った。各測定終了時にオープンフィールドおよび箱は水で清拭し、十分に乾燥させた。

1-2-6. スクロース嗜好性試験

スクロース嗜好性試験は、抑うつ様行動の評価に用いた。水道水または 1% sucrose 溶液を 230 mL ずつボールポイント給水先管を取り付けたボトルに移した。試験期間中は、マウスを単独飼育し、試験開始 2 日前から 2 本の水道水が入った給水ボトルをケージへ設置し、試験条件に順化させた。その後、水道水および 1% sucrose 溶液の入った給水ボトルを 1 本ずつケージへ設置し、マウスに自由摂取させた。給水ボトルは 24 時間ごとに位置を入れ替え、重量を測定し、摂取量として記録した。抑うつ様行動は、1 日の総摂水量に対する 1% sucrose 溶液の摂水量の割合を算出 (スクロース嗜好性) し、評価した。

1-2-7. 脳組織からのモノアミン抽出および LC-MS/MS

視床下部、海馬、中脳および延髄におけるモノアミンは、Monospin PBA column (GL サイ

エンス株式会社, 東京、日本) を用いて抽出した。COSMOSIL PBr column: 2.0 mm internal diameter ×150 mm (ナカライテスク株式会社、京都、日本) を用いて 2690 instrument (Waters Corporation, Milford, MA, USA) にて HPLC 分離を行った。移動相 (A) として 10 mM ammonium formate (pH 4.0) および acetonitrile (B) を用いた。流速 0.2 mL/min にて、100% A を 3 分間、100% A から 40% A を 12 分間、40% A から 100% A を 10 分間の順にカラムに流した。モノアミンの定量解析には Quattro Ultima (Waters Corporation) を用いて、ポジティブイオンモード、selective multireaction monitoring (MRM) を行った。20 V、100°C にて試料溶液を霧状化し、20 eV で衝突させ、フラグメントイオンを生成させた。モノアミンは [M-H]⁺ から得られたプロダクトイオン (m/z 154→91: dopamine, m/z 169.9→107: noradrenaline, m/z 177→115.1: serotonin) から特定した。各モノアミン量は、ピーク面積から絶対検量線法を用いて算出した。

1-2-8. 統計学的処理

2 群間の比較には、F 検定を行った後、Student's *t* test を用いて統計学的解析を行った。社会性相互作用試験は、two-way ANOVA 解析を行った後に、Bonferroni's post hoc test を用いて統計学的解析を行った。全ての結果は平均 ± 標準誤差 (standard error of the mean; S.E.M.) として表した。有意差は、危険率 5% を基準とした。

1-3. 結 果

1-3-1. GPR40/FFAR1 の欠損が不安様行動に及ぼす影響

高架式十字迷路試験において、4本の arm への侵入回数は WT および GPR40^{KO} 間でなんら変化を示さなかった (Fig. 2a)。GPR40^{KO} の open arm への侵入率は、WT と比較して有意に増加した (Fig. 2b)。さらに、GPR40^{KO} の open arm への滞在時間は、WT と比較して、有意に延長した (Fig. 2c)。オープンフィールド試験において、自発運動量は、WT および GPR40^{KO} 間でなんら変化は示さなかった (Fig. 2e)。GPR40^{KO} の center 領域への滞在時間は、WT と比較して有意に延長した (Fig. 2d, f)。

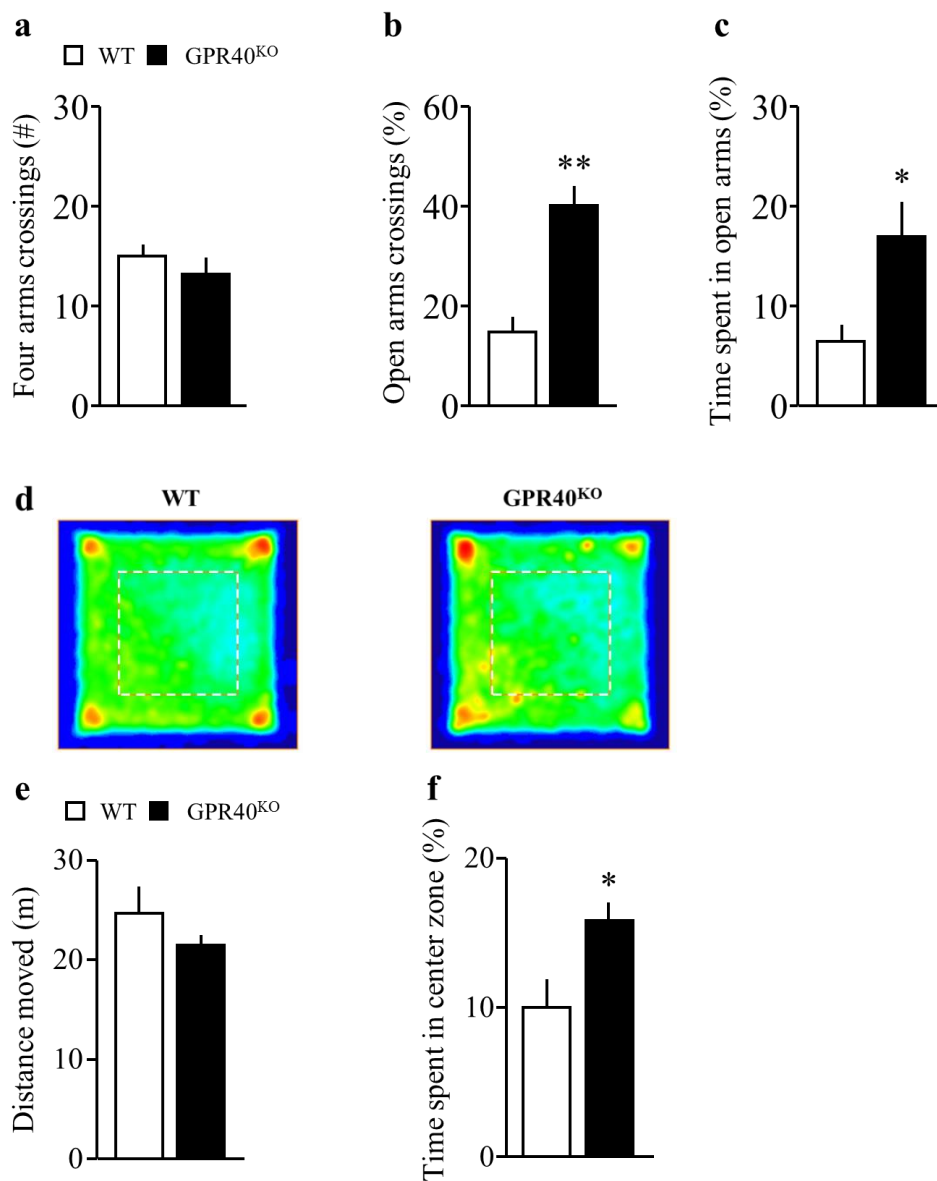


Fig. 2. Effect of GPR40/FFAR1 deletion on anxiety-like behavior in the EPM and OF.

- a. The number of entries into four arms in the EPM.
- b. The ratio of crossing open arms in the EPM.
- c. The ratio of time spent in open arms in the EPM.
- d. Represented moving plots both WT and GPR40^{KO} in the OF. White dots square represents center zone.
- e. The total distanced moved during experiment in the OF.
- f. The ratio of time spent in center zone in the OF.

(EPM and OF; WT = 10, GPR40^{KO} = 9).

Statistical comparisons are performed using unpaired-Student's *t* test; **P* < 0.05, ***P* < 0.01 vs. WT.

EPM, elevated plus-maze test; OF, open field test

Data are presented as mean±S.E.M.

1-3-2. GPR40/FFAR1 の欠損が抑うつ様行動に及ぼす影響

スクロース嗜好性試験において、GPR40^{KO} のスクロース嗜好性は、WT と比較して有意に減少した (Fig. 3a)。GPR40^{KO} の総飲量は、WT と比較して有意に減少した (Fig. 3b)。GPR40^{KO} の摂水量に変化は見られなかったが、スクロース摂水量は、WT と比較して有意に減少した (Fig. 3c, d)。

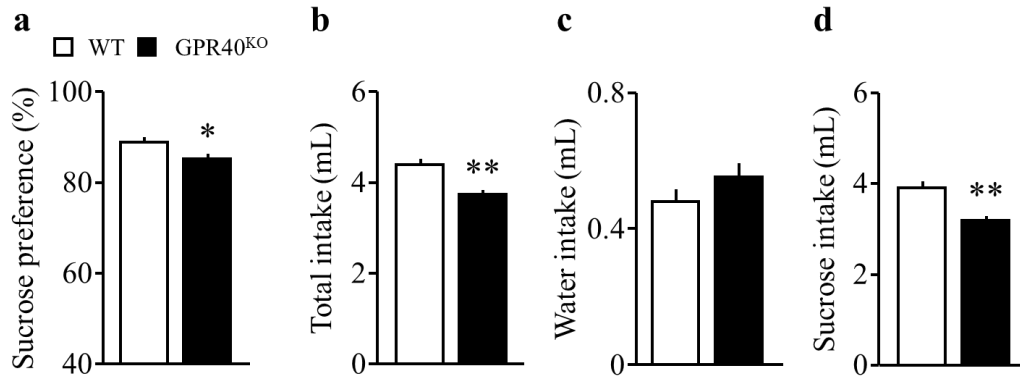


Fig. 3. Effect of GPR40/FFAR1 deletion on depression-like behavior in the sucrose preference test.

a. The ratio of preference for sucrose between consecutive 3 days.

b. The volume of total intake of water and sucrose.

c. The volume of water intake.

d. The volume of sucrose intake.

(WT = 10, GPR40^{KO} = 9).

Statistical comparisons are performed using unpaired-Student's *t* test; **P* < 0.05, ***P* < 0.01 vs. WT.

Data are presented as mean ± S.E.M.

1-3-3. GPR40/FFAR1 の欠損が社会性行動に及ぼす影響

社会性相互作用試験において、WT および GPR40^{KO} は、no target と比較して target において、interaction 領域への滞在時間が有意に延長した (Fig. 4a, c)。しかしながら、WT および GPR40^{KO} 間において、社会性行動はなんら変化を示さなかった。WT と GPR40^{KO} の総移動距離は同程度であった (Fig. 4b)。

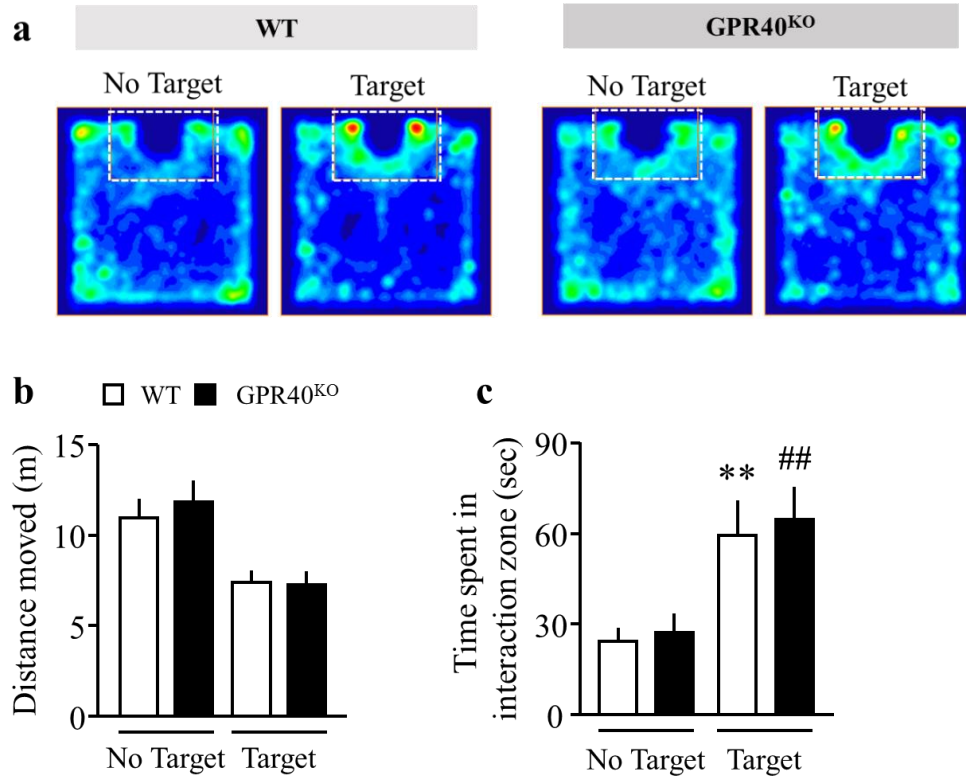


Fig. 4. Effect of GPR40/FFAR1 deficiency on social behavior in the social interaction test.

a. Represented moving plots both WT and GPR40^{KO}. White dots square represents interaction zone.

b. The total distance moved during no target and target session.

c. The time spent in the interaction zone during no target and target sessions.

(WT = 10, GPR40^{KO} = 9).

A two-way analysis of variance followed by Bonferroni's post hoc test revealed the significantly difference of time spent in interaction zone (time: $F_{1,16} = 34.23$, $P < 0.01$, genotype: $F_{1,16} = 0.1382$, $P > 0.05$).

** $P < 0.01$ vs. no target WT, ## $P < 0.01$ vs. no target GPR40^{KO}

Data are presented as mean \pm S.E.M.

1-3-4. Serotonin、noradrenalin および dopamine 量に対する GPR40/FFAR1 欠損の影響

GPR40^{KO} の serotonin 量は、WT と比較して、視床下部、中脳、延髄においてはなんら変化を示さなかった (Fig. 5a, g, j)。一方で、GPR40^{KO} の serotonin 量は海馬において WT と比較して、有意に増加した (Fig. 5d)。GPR40^{KO} の noradrenalin 量は WT と比較して、視床下部、中脳、延髄、海馬のいずれの領域においても有意に増加した (Fig. 5b, e, h, k)。GPR40^{KO} の dopamine 量は、視床下部、中脳、延髄においてはなんら変化を示さなかった (Fig. 5c, i, l)。GPR40^{KO} の dopamine 量は WT と比較して、海馬において有意に増加した (Fig. 5f)。

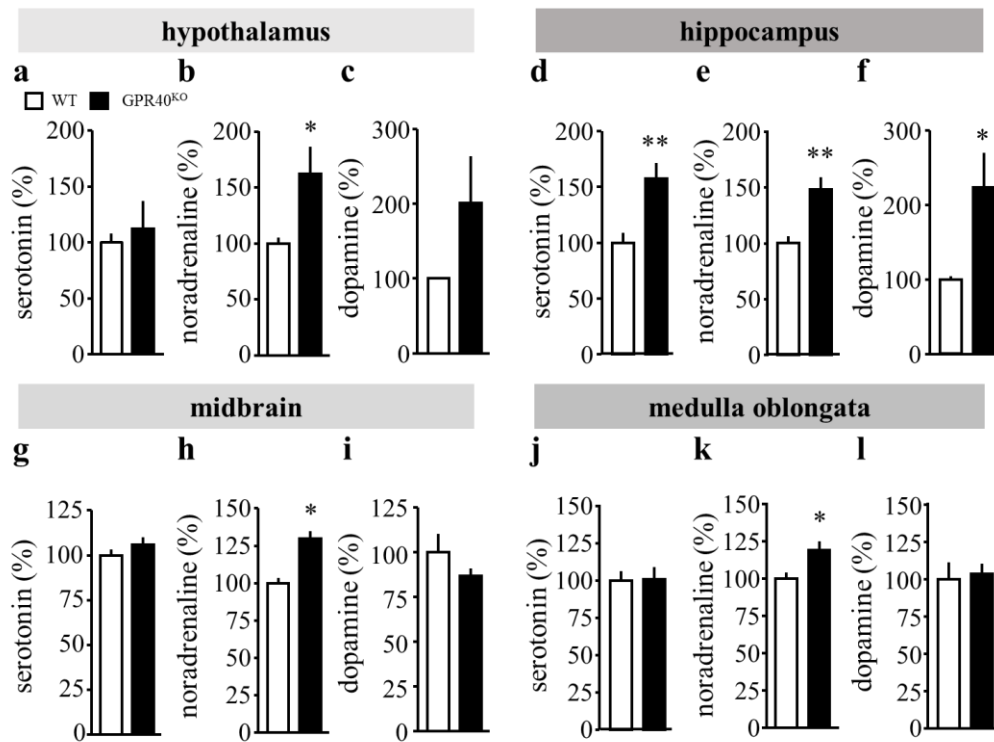


Fig. 5. The profile of monoamine in WT and GPR40^{KO} mice.

a-c. The level of monoamine in the hypothalamus.

d-f. The level of monoamine in the hippocampus.

g-i. The level of monoamine in the midbrain.

j-l. The level of monoamine in the medulla oblongata.

Each result expressed as the percentage of content of WT.

(WT = 12, GPR40^{KO} = 12).

Statistical comparisons are performed using unpaired-Student's *t* test; **P* < 0.05, ***P* < 0.01 vs. WT

Data are expressed as mean ± S.E.M.

1-4. 考 察

第一章では、情動機能制御に対する脳内 GPR40/FFAR1 の影響について検討するために、GPR40^{KO} マウスを作製し、各種行動試験を用いて情動機能を解析した。マウスでは脳内において GPR40/FFAR1 が神経細胞特異的に発現していることが見出されている。さらに、我々の先行研究において、GPR40/FFAR1 は serotonin および noradrenalin 作動性神経系に局在していることを報告している。また、GPR40/FFAR1 のアゴニストをマウス脳内へ投与すると、serotonin ならびに noradrenalin 作動性神経系の神経投射先である脊髄においてこれらモノアミン濃度が上昇することから、GPR40/FFAR1 の活性化がモノアミンの分泌調節を担っていることも示している。脳内における serotonin および noradrenalin の減少は、うつ病や不安障害などの情動機能の異常を示すことが知られている³⁵⁾。そのため、中枢神経系、特に脳内に発現する GPR40/FFAR1 の欠損によって、モノアミン神経系の機能異常を介した情動機能異常が誘導されている可能性が考えられた。

まず、高架式十字迷路試験およびオープンフィールド試験を用いて、不安様行動を検討した。GPR40^{KO} マウスは、高架式十字迷路試験において不安様行動の指標である open arm への滞在時間の減少が消失した。さらに、オープンフィールド試験における不安様行動の指標である center 領域への滞在時間の減少も消失した。これまでに、脂肪酸が不安様行動の制御に関与することが示唆されている。例えば、マウスに飽和脂肪酸である palmitic acid (C16:0) を投与すると、情動機能の制御に密接に関与している扁桃体において、serotonin の主要代謝物である 5-hydroxyindole acetic acid の増加と共に、不安様行動が惹起されることが報告されている³⁸⁾。Contreras らは、myristic acid (C14:0) がラットにおいて diazepam と同様の抗不安様作用を有することを示している³⁹⁾。また、この作用には γ -aminobutyric acid-A (GABA_A) 受容体が見出されている。Palmitic acid や myristic acid は GPR40/FFAR1 に結合する中一長鎖脂肪酸であることから、GPR40/FFAR1 の欠損によって生じる抗不安様作用には、このような脂肪酸を介したシグナルの変化が関連すると推察される。また、高架式十字迷路試験は open arm への滞在率を指標として衝動性の評価にも用いられることが報告されている⁴⁰⁾。GPR40^{KO} マウスは WT マウスと比較して open arm への滞在率が有意に増加していたことから、GPR40/FFAR1 を介したシグナルの破綻が異常な行動を引き起こしている可能性が考えられる。

次に、スクロース嗜好性試験を用いて、抑うつ様行動に対する GPR40/FFAR1 の関与について検討した。抑うつ様行動の指標である sucrose への嗜好性の低下は、GPR40^{KO} マウスで観察された。DHA や eicosapentaenoic acid (EPA) の減少は、うつ病の罹患率と関連することが知られている³⁰⁾。しかしながら、DHA や EPA の減少が抑うつ様行動を惹起する機構は、ほとんど明らかにされていない。Nishinaka らの報告において、GPR40/FFAR1 作動薬の反復投与によって、マウスにおける抑うつ様行動は改善することが示されている³²⁾。GPR40^{KO} マウスでは抑うつ様行動がみられたことから、臨床において DHA や EPA の減少と共に認められる抑うつ症状の発現には GPR40/FFAR1 シグナルの低下あるいは機能不

全が関与している可能性がある。抑うつ症状は、男性と比較して女性に多くみられることが知られている^{41,42)}。我々は、GPR40^{KO} 雌性マウスにおいても同様の行動解析をおこなっているが、雌性マウスにおいても抗不安様行動、ならびに抑うつ様行動が観察され、さらに社会性行動の低下も認められた⁴³⁾。性差が生じた原因に関しては不明であるが、近年では、性ホルモンである testosterone や estradiol は不安や社会性行動の制御に重要であることが報告されている⁴⁴⁾。これらが各種情動行動の雌雄差に関連する可能性が考えられるが、詳細についてはさらなる検討が必要となる。以上の結果から、少なくとも GPR40/FFAR1 は不安や抑うつといった情動の制御に一部関与することが示めされた。

近年、不安や抑うつ症状などに伴う情動行動は、脳内のどの領域、どの神経系によって制御されているかが解明されつつある。中でも serotonin、noradrenalin、dopamine などのモノアミン神経系は、不安や抑うつ症状を制御していることが知られている。これら神経系の責任脳領域としては、海馬、中脳、視床下部が注目されている⁴⁵⁾。マウスにおいて GPR40/FFAR1 は海馬、中脳、視床下部に発現しているが、延髄においても GPR40/FFAR1 が発現する serotonin 作動性神経が存在する。以上から、GPR40/FFAR1 の欠損がこれらの領域における各種モノアミン量に及ぼす影響について検討した。GPR40^{KO} マウスは、海馬において serotonin、noradrenalin、dopamine 全てが有意に増加した。海馬は、成人においても神経新生の起こる脳領域であり、学習・記憶を担うことが知られている⁴⁶⁾。それ以外にも、うつ病患者において海馬の萎縮が認められることから、海馬は抑うつに関わることが知られている⁴⁷⁾。Malberg らは、ラットに fluoxetine を慢性投与し、神経新生が亢進すること⁴⁸⁾、Boldrini らによる抗うつ薬を投与されていたうつ病患者の死後脳解析の検討では、神経幹細胞が多いことが示されており⁴⁹⁾、海馬における神経新生が抑うつ様行動の発現に関連すると考えられている。海馬に発現する GPR40/FFAR1 は、cAMP response element-binding protein の活性化を介して神経新生を担うことも見出されている³³⁾。海馬には、延髄の縫線核から serotonin 作動性神経が、中脳の青斑核および腹側被蓋野からは、それぞれ noradrenaline 作動性神経、および dopamine 作動性神経が入力している^{50,51)}。これらの報告から、海馬は抑うつや不安を制御する脳の中継領域として機能し、GPR40/FFAR1 シグナルの欠損が各種モノアミン作動性神経系の機能を破綻させたことで GPR40^{KO} マウスの異常行動の発現につながったと推察される。

中脳の青斑核および中脳から延髄にかけて存在する縫線核には、それぞれ noradrenalin、serotonin 作動性神経の起始核が存在する。先行研究において、青斑核および大縫線核における GPR40/FFAR1 作動薬の局所投与は noradrenalin および serotonin 作動性神経に神経活性マーカーである c-fos の発現を誘導することから、GPR40/FFAR1 が noradrenalin および serotonin 作動性神経を制御することを見出している²⁶⁾。これらの領域は、海馬および視床下部に serotonin および noradrenalin 作動性神経を投射し、シナプスを形成している。Mathieu らは、DHA がヒト神経芽細胞種である SH-SY5Y 細胞から noradrenalin の放出を誘導することを報告している⁵²⁾。以上の知見から noradrenalin の放出制御には、脂肪酸—

GPR40/FFAR1 を介したシグナル機構が存在していることが期待されるが、GPR40/FFAR1 は脳以外にも、網膜、嗅球などの感覚器等に発現しており、本研究で用いた GPR40^{KO} マウスは組織特異的ではなく、全身性欠損マウスであるため、それらの影響については検討できていない。本研究で認められた行動変化に対する責任脳領域の特定には、さらに詳細な検討が必要となる。

以上第一章において、情動機能制御に対する GPR40/FFAR1 の関与について明らかにした。GPR40^{KO} マウスを用いた検討によって、GPR40/FFAR1 は雄性マウスにおいて社会性行動ではなく、抑うつおよび不安様行動を制御していることが示された。また、この行動変化とともに脳内における noradrenalin の増加が認められた。うつ病や不安障害においては脳内におけるモノアミン神経系の制御が重要であることから、脂肪酸—GPR40/FFAR1 シグナル系はこれまでのモノアミントランスポーター阻害ではなく、直接モノアミン神経系を賦活化する新たな抗うつ薬および抗不安薬の標的となる可能性が期待される。また、脳内における GPR40/FFAR1 シグナル機構を解明することで、抑うつおよび不安症状の病態に関わる分子メカニズムの詳細が明らかになる可能性が示された。

第二章 脳内の脂質環境の調節因子としてのアストロサイトの機能解析

2-1. 緒 言

第一章における検討から、脳内の GPR40/FFAR1 は痛みのみならず、不安や抑うつ様症状などの情動機能制御に関与することが示された。GPR40/FFAR1 のリガンドとして知られる n-3 系脂肪酸の DHA は、慢性疼痛患者やうつ病患者の血清において減少していることが報告されている⁵³⁾。脳に発現する GPR40/FFAR1 は痛みと情動機能の制御に関わることから、慢性疼痛時に認められる DHA の減少は末梢と同様に脳内においても生じている可能性が考えられる。しかしながら、どの細胞種によって脳内の脂肪酸が制御されているかは不明であった。

脳内には神経細胞をはるかに凌ぐ数のグリア細胞が存在している。中でも、アストロサイトは、血液脳関門の形成やシナプス形成の補助、また神経幹細胞として神経へ分化するなど多岐にわたる生理機能を有することで、脳内環境の恒常性維持に寄与している^{54,55)}。さらに、アストロサイトが合成した乳酸や神経栄養因子、ATP などは細胞間隙に放出され、神経細胞に取り込まれ栄養分として用いられている他、細胞膜上に発現する受容体を介したシグナル伝達を亢進させる^{56,57)}。以上の報告から、アストロサイトは脳内におけるシグナル伝達の起点の一つとしてとらえられている。

古くからアストロサイトは ATP、glutamic acid などの刺激に応答して DHA や arachidonic acid を放出することが知られている⁵⁸⁾。ATP や glutamic acid は、痛みの惹起および伝達に関わることから、疼痛治療の標的として注目されている⁵⁹⁾。先行研究において、末梢に炎症を惹起した炎症性疼痛モデルマウスの視床下部では、アストロサイトの発現量ならびに DHA 量が増加することを見出している²⁵⁾。さらにこの現象は、cyclin-dependent kinase の阻害剤である flavopiridol を処置し、アストロサイトの増殖能を低下させることで抑制された。以上から、慢性疼痛下で生じる脂質環境の変化にはアストロサイトが関与している可能性がある。

よって、第二章では、ラット大脳皮質由来初代培養アストロサイトを作製し、疼痛模倣刺激として lipopolysaccharide (LPS) を用いて、LPS 刺激後のアストロサイトにおける脂肪酸動態の変化と、アストロサイトの脂肪酸遊離能について検討した。

本章の研究内容の一部は、下記の論文として公表した。

1. Aizawa F, Nishinaka T, Yamashita T, Nakamoto K, Koyama Y, Kasuya F, Tokuyama S. Astrocytes Release Polyunsaturated Fatty Acids by Lipopolysaccharide Stimuli. *Biol. Pharm. Bull.*, **39**, 1100–1106 (2016)

2-2. 実験材料および方法

2-2-1. 実験動物

Wistar 系ラット（妊娠 17 日齢）を日本 SLC 株式会社から購入し、出生 0-4 日齢のラットを実験に用いた。温度 24°C、湿度 55 ± 5% の環境下において明暗サイクルが 12 時間（AM 8:00 点灯、PM 8:00 消灯）の室内にて飼育した。なお、固形飼料（オリエンタル酵母）および水は自由に摂取させた。全ての実験は、日本薬理学会が策定する動物実験に関する指針に従い、また、神戸学院大学動物委員会の承認を得て行った（承認番号：14-19）。

2-2-2. ラット大脳皮質由来初代培養アストロサイトの作製

ラット大脳皮質由来初代培養アストロサイトは Koyama らの方法を改変し作製した⁶⁰⁾。0-4 日齢のラットを氷冷にて全身麻酔し、断頭後、全脳を摘出した。全脳は Minimum essential Medium EAGLE Joklik (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) に浸し、氷冷下にて、大脳皮質を単離した。単離した大脳皮質から髄膜を剥離し、髄膜細胞を除去した。大脳皮質は、D-PBS [NaCl 4.0 g, KCl 0.1 g, KH₂PO₄ 0.1 g, Na₂HPO₄ 0.57 g, phenol red 3 mg, MQ 水 500 mL] および 0.05 mM EDTA を含む trypsin (Gibco, Grand Island, NY) (終濃度: 0.25%) に加え、溶液が白濁するまで静かにピペッティングした。懸濁溶液は、37°C、9 分間反応させ、等量のイーグル MEM 培地「ニッスイ」[MEM(+)] (日水製薬株式会社、東京、日本) [10% NaHCO₃, 200 mM L-glutamine (Gibco), FBS (Biowest, Nuaille, France)] 加え攪拌し、反応を停止させた後、上清 10 mL を除去した。懸濁液と等量の MEM(+) を加え攪拌し、上清 10 mL を新たなコニカルチューブへ分取した。この操作を 5 mL MEM(+)/brain となるよう繰り返した。上清は、室温にて遠心分離 (1,000 rpm、5 分) した。上清を除去し、MEM(+) を加えペレットを懸濁させ、32 μm のナイロンメッシュに通して濾過し、得られた濾過液を 75 cm² 培養フラスコへ播種した。これを CO₂ インキュベーター (Forma Steri-Cult CO₂ Incubators; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で 37°C、5% CO₂、相対湿度 95% の条件で約 2 週間培養した。培養フラスコは 37°C、7 時間振盪培養し、ミクログリアとオリゴデンドロサイト前駆細胞からなる原形質細胞層を除去した。D-PBS で 2 回洗浄した後、0.25% trypsin を含む D-PBS を加え 5 分間振盪反応させた。等量の MEM(+) を加え反応を停止させ、アストロサイトを剥離した。懸濁液は、室温にて遠心分離 (1,000 rpm、5 分) し、上清を除去後、MEM(+) を加え再懸濁させ、6 または 24-well culture plate にて培養し、各種実験に用いた。

2-2-3. LPS 処置および細胞生存率の評価

96-well culture plate に播種したアストロサイトに 0.22 μm フィルター (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Germany) を用いて濾過滅菌した LPS from *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich) を 1, 10, 100, 1,000 ng/mL となるよう処置し、37°C、5% CO₂、湿度 95% にて 24 時間培養した。培地交換を行い、生細胞測定試薬である

2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, mono sodium salt (ナカライテスク株式会社) を添加し、CO₂ インキュベーターにて 1 時間呈色反応させた。Corona grating microplate reader (SH-1200; コロナ電気株式会社、茨城、日本) にて、主波長 450 nm および副波長 640 nm における吸光度を測定し、相対細胞生存率を算出した。

2-2-4. 蛍光免疫組織染色および形態評価

直径 15 mm のカバーガラス (松浪硝子工業、大阪、日本) にアストロサイトを播種し、LPS 100, 1,000 ng/mL 処置を行ったものを蛍光免疫染色用サンプルとした。薬物処置後、D-PBS で 3 回洗浄し、4% formalin (富士フイルム和光純薬株式会社、大阪、日本) を含む PBS にて 5 分間の後固定を行った。後固定後、PBS-T [PBS (pH 7.2), 0.1% Tween20] を用いて 5 分ごとの洗浄を 5 回行った。3% BSA を含む PBS 中で 1 時間、室温にてインキュベートした後、一次抗体として mouse anti-GFAP monoclonal anti body (1:10,000; Merck Millipore, Burlington, MA, USA) を添加し、4°C にて一晩反応させた。反応後、PBS-T で 5 分ごとの洗浄を 5 回行った。二次抗体として、Alexa fluoro594 (goat polyclonal anti-mouse IgG, 1:200; Life Technologies, Inc., CA, USA) を添加し、遮光下、室温にて 2 時間インキュベートした。一次抗体および二次抗体は、いずれも 1% BSA を含む PBS-T 溶液中にて希釈した。続いて、遮光下にて PBS-T で 5 分ごとの洗浄を 5 回行い、4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI) で 10 分間処理し、核染色を行った。再度、PBS-T で洗浄し、Fluoromount/Plus (Dianostic Biosystems, Pleasanton, Canada) と MAS-coated glass slide (松浪硝子工業) を用いて封入した。細胞形態は、共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000; オリンパス株式会社、東京、日本) を用いて標識タンパク質の蛍光シグナルを検出し、評価した。

2-2-6. ラット大脳皮質由来アストロサイト抽出液および細胞培養液の調製ならびに LC-MS/MS 用サンプルの調製

6-well culture plate にて培養し、薬物処置を行ったものを LC-MS/MS 用サンプルとした。処置後の初代培養アストロサイトは D-PBS で 3 回洗浄し、セルスクレイパーで擦り取りチューブへ回収した。細胞懸濁液は、15,000×g、15 分間遠心分離し、上清を新たなチューブへと分取した。細胞培養液は、処置後の培養液をチューブへ回収し、遠心分離した上清をサンプルとして用いた。CAPCELL PAK UG120 column: 1.0 mm i.d.×150 mm (資生堂、東京、日本) を有する Agilent 1290 Infinity LC (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) を用いて HPLC を行った。移動相 (A) として 10 mM ammonium formate (pH 3.5) および acetonitrile (B) を用いた。流速 0.2 mL/min にて 13% A を 5 分間、13% A から 5% A を 5 分間、5% A を 5 分間、5% A から 13% A を 5 分間、13% A を 5 分間の順にカラムに流した。脂肪酸の定量解析には QTRAP 4500 (AB SCIEX, Framingham, MA, USA) を用いて、ネガティブイオンモードにて、selective multireaction monitoring (MRM) を行った。-4,500 V、300°C にて試料溶液を霧状化し、-70 から -105 V 条件下で電子イオン化を行った後、-10

から -22 eV で衝突させ、フラグメントイオンを生成させた。各種遊離脂肪酸は $[\text{M}-\text{H}]^-$ から得られたプロダクトイオン (m/z 255 \rightarrow 255: C16:0, m/z 279 \rightarrow 279: C18:2, m/z 281 \rightarrow 281: C18:1, m/z 283 \rightarrow 283: C18:0, m/z 303 \rightarrow 303: C20:4, m/z 327 \rightarrow 327: DHA) から特定した。各遊離脂肪酸濃度は、ピーク面積から絶対検量線法を用いて算出した。

2-2-7. ラット大脳皮質由来アストロサイト RNA 抽出液および real-time PCR

6-well culture plate にて培養し、薬物処置を行ったものを RNA 抽出サンプルとした。RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて RNA を抽出し、nanodrop lite (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて RNA 濃度を測定した。PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (タカラバイオ株式会社、滋賀、日本) および PCR Thermal Cycler (タカラバイオ株式会社) を用いて cDNA を調製した。Real-time PCR は、調製した cDNA、Table 2 の各種 primer、および FastStart Essential DNA Green Master (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いて SYBER-GREEN 法にて行った。相対的 mRNA 発現量は、housekeeping gene として β -actin を用いた comparative threshold cycle method ($\Delta\Delta\text{CT}$ 法) によって解析した。

Table 2 Sequence of primers

gene	primer 1	primer 2
<i>cpla2</i>	AAC AGA GCA ACG AGA TGG	AAC AGA GCA ACG AGA TGG
<i>ipla2</i>	ATT GAT AAC AGA ACT CGA GC	GAT GAA TCG GCT TCT GAG TA
<i>β-actin</i>	GAA CCC TAA GGC CAA CCG TG	TGG CAT AGA GGT CTT TAC GG

2-2-8. 統計学的処理

One-way ANOVA 解析を行った後に、Dunnet's multiple comparison test を用いて統計学的解析を行った。全ての結果は平均 \pm 標準誤差 (standard error of the mean; S.E.M.) として表した。有意差は、危険率 5% を基準とした。

2-3. 結 果

2-3-1. LPS 処置 24 時間後の初代培養アストロサイトにおける細胞毒性評価および形態変化

LPS (1-1,000 ng/mL) の 24 時間処置は、vehicle 群と比較して、細胞生存率に何ら変化を示さなかった (Fig. 6a)。初代培養アストロサイトにおける GFAP の発現は、LPS 100 ng/mL および 1,000 ng/mL を 24 時間処置することによって、vehicle 群と比較して増加した (Fig. 6b)。

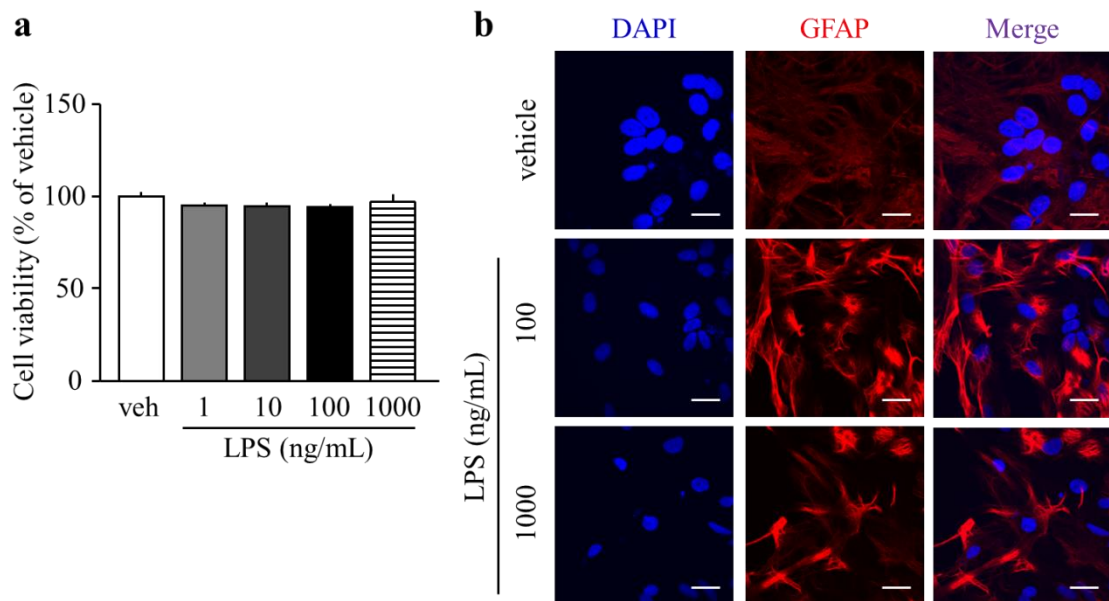


Fig. 6. The effect of LPS to cell viability and morphology in the primary astrocyte.

a. Cell viability of primary astrocyte with LPS for 24 h.

(each group; n = 4).

b. Represent images of the immunohistological-staining of GFAP in primary astrocyte with LPS for 24h. DAPI:

nucleus marker, GFAP; astrocyte marker. Scale bars: 20 μ m

Data are presented as mean \pm S.E.M.

2-3-2. LPS 処置 24 時間後の初代培養アストロサイトにおける遊離脂肪酸量の解析

LPS 処置 24 時間の時点において、LPS 100 ng/mL 処置は、アストロサイトにおける C16:0、C18:0、C18:1、C18:2、および C22:6 量を、vehicle 群と比較して有意に増加させた (Fig. 7a-d, f)。LPS 1,000 ng/mL 処置は、アストロサイトにおける C16:0、C18:0、C18:1、C18:2、C20:4、および C22:6 量を vehicle 群と比較して有意に増加させた (Fig. 7a-f)。

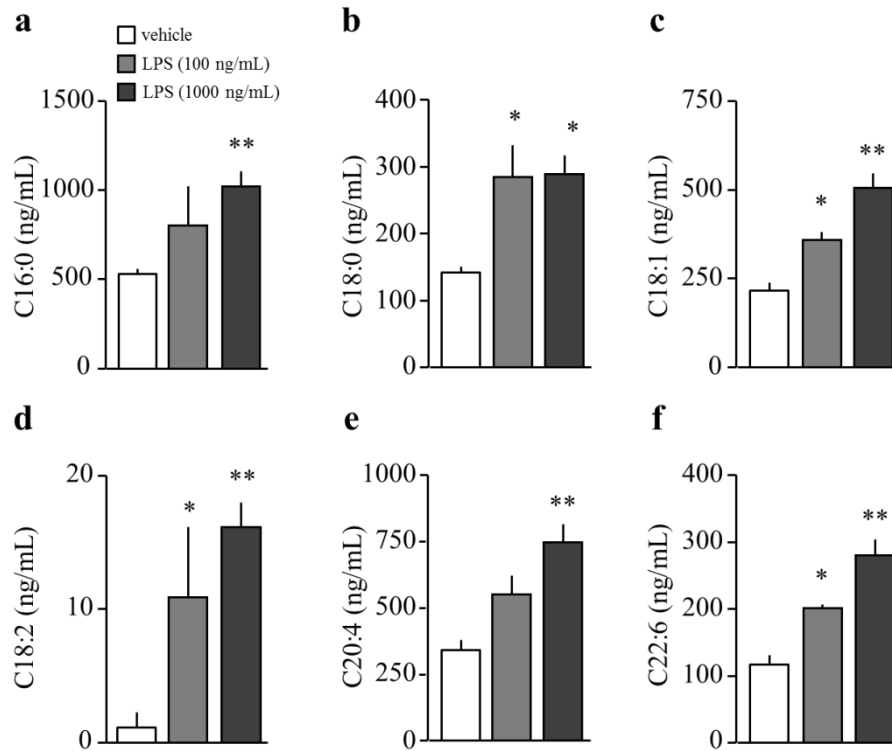


Fig. 7. The changes in long chain fatty acids of astrocyte after LPS stimuli.

a. Amount of palmitic acid.

b. Amount of stearic acid.

c. Amount of oleic acid.

d. Amount of linoleic acid.

e. Amount of arachidonic acid.

(each group; n = 3).

A one-way analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparison test. *P < 0.05, **P < 0.01 vs vehicle.

Data are presented as mean±S.E.M.

2-3-3. LPS 処置 24 時間後の初代培養アストロサイト培養液における遊離脂肪酸量の解析

LPS 100 ng/mL 処置は、vehicle 群と比較して、LPS 100 ng/mL 処置は、アストロサイト培養液中における C16:0、C18:0、C18:1、C18:2、および C22:6 量に何ら影響を示さなかった (Fig. 8a-e)。LPS 1,000 ng/mL 処置は、アストロサイト培養液中における C22:6 量を vehicle 群と比較して有意に増加させた (Fig. 8f)。

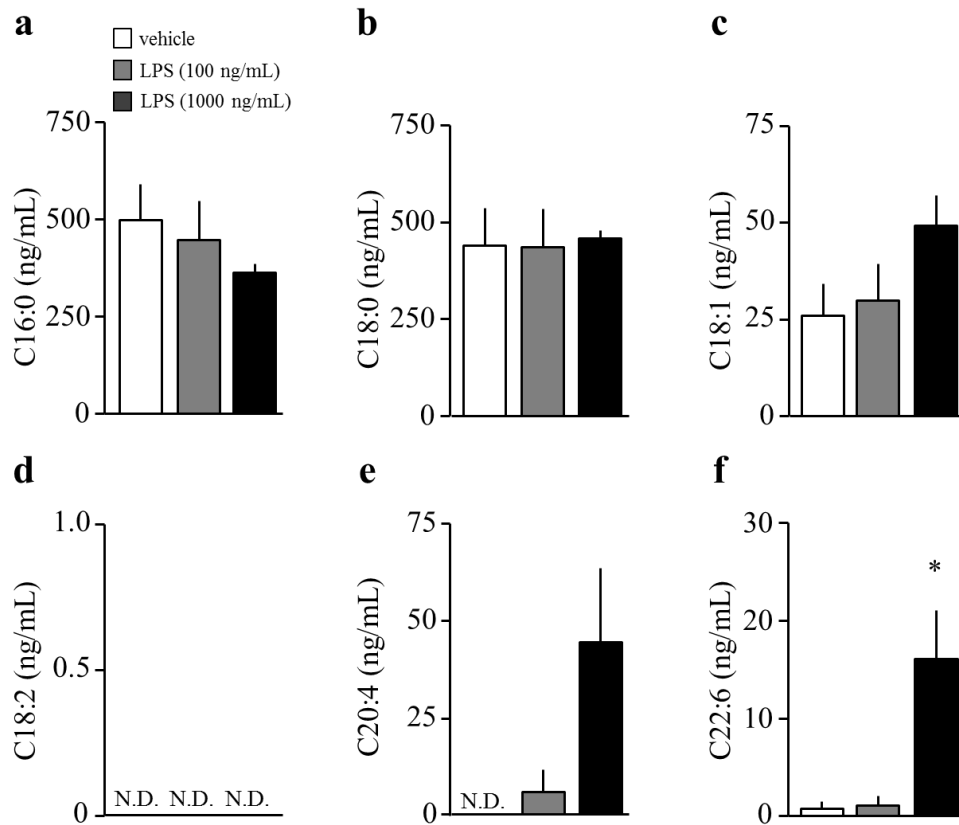


Fig. 8. The changes in long chain fatty acids of release from astrocyte after LPS stimuli.

a. Amount of palmitic acid.

b. Amount of stearic acid.

c. Amount of oleic acid.

d. Amount of linoleic acid.

e. Amount of arachidonic acid.

f. Amount of DHA.

(each group; n = 4).

A one-way analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparison test. *P < 0.05 vs vehicle.

N.D., not detect.

Data are presented as mean±S.E.M.

2-3-4. LPS 処置 24 時間後の初代培養アストロサイトにおける cPLA₂ および iPLA₂ mRNA 発現変化

LPS 100 ng/mL 処置は、vehicle 群と比較して、cPLA₂ mRNA を有意に増加させた (Fig. 9a)。LPS 処置 24 時間の時点において、LPS 1,000 ng/mL 処置は、vehicle 群と比較して、cPLA₂ および iPLA₂ mRNA を有意に増加させた (Fig. 9a, b)。

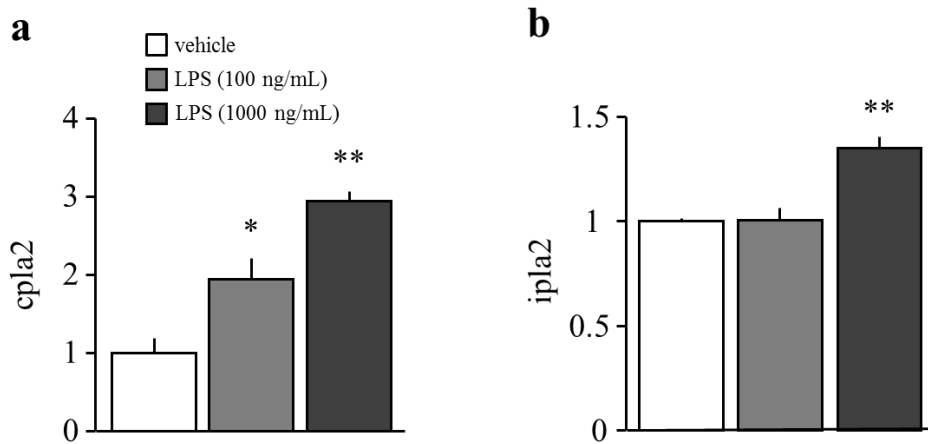


Fig. 9. The changes in phospholipases of primary astrocyte after LPS stimuli for 24hr.

a. The expression of cPLA₂ mRNA in primary astrocyte with LPS.

b. The expression of iPLA₂ mRNA in primary astrocyte with LPS.

(each group; n = 3).

A one-way analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparison test. *P < 0.05, **P < 0.01, vs vehicle.

Data are presented as mean±S.E.M.

2-4. 考 察

第二章では、疼痛および情動機能異常病態下、脳内で生じる脂質環境の変動因子としてアストロサイトに着目し、初代培養アストロサイトからの遊離脂肪酸の放出について検討した。

ストレス暴露や神経障害性疼痛によって、神経の発火頻度や樹状突起密度の変化が生じるが、グリア細胞であるアストロサイトやミクログリアの活性化や構造・機能変化が生じることも知られている^{48,59,61-63)}。アストロサイトは、血管周囲を取り囲み、血液脳関門の一部として、脳へのエネルギー取り込みや異物の侵入抑制に関与している⁶⁴⁾。また、アストロサイト近傍の血管内皮細胞には、脳内への DHA 取り込みに関与する *Mfsd2a* が発現していることも報告されている⁶⁵⁾。近年、グリアー神経間のクロストークが存在するとされており、相互にミトコンドリアなどの因子を授受できる可能性が示唆されている^{66,67)}。以上から、病態下におけるアストロサイトの機能および構造変化が、脳内の脂肪酸環境の調節に関与する可能性が考えられる。そこで、ラット大脳皮質由来初代培養アストロサイトを作製し、活性化後のアストロサイトからの遊離脂肪酸放出能について検討をおこなった。

まず、初代培養アストロサイトに、その形態変化を誘導することが知られている LPS を処置し、構造変化を解析した。24 時間の LPS 処置によって、アストロサイトの細胞線維性酸性タンパク質である GFAP の蛍光強度の増加、および細胞体の拡大が認められた。この変化は、炎症性サイトカインや ATP などによって機能または性質が変化した反応性アストロサイトで認められる。反応性アストロサイトは、脳梗塞などの脳の器質変化と共に認められ、損傷部位近傍に集積することでグリア瘢痕を形成し、異物の侵入を防ぐことが知られている⁵⁶⁾。また、脊髄においてはグリア瘢痕の形成が神経軸索の伸長を促進させることが報告されている⁶⁸⁾。これらの報告から、LPS によって生じたアストロサイトの構造的な変化は、慢性疼痛などの病態に伴って変化したアストロサイトと同様に、侵害刺激から生体を保護する機能があると推察される。

次に、反応性アストロサイトの細胞内における遊離脂肪酸の変化を解析した。24 時間の LPS 処置によって、アストロサイト細胞内において *palmitic acid*、*stearic acid*、*oleic acid*、*linolenic acid*、*arachidonic acid*、および DHA 全ての脂肪酸が有意に増加した。アストロサイトは、ATP や *glutamic acid* 処置によって DHA や *arachidonic acid* を放出する能力を有していることから、アストロサイト細胞内で増加した遊離脂肪酸が、細胞外へ放出される可能性がある。そこで、アストロサイトの細胞内遊離脂肪酸が増加した時点において、アストロサイト培養液を採取し、培養液中に含まれる遊離脂肪酸を解析することでアストロサイトの脂肪酸放出能について検討をおこなった。興味深いことに、細胞内では測定した全ての遊離脂肪酸が増加したのに対し、細胞外で増加した脂肪酸は DHA のみであった。細胞は、リン脂質を主体とする脂質二重膜で形作られており、分子の大きさ、脂溶性、電荷の違いによって物質の行き来が制限されている⁶⁹⁾。脂肪酸は脂溶性が高く、一部の脂肪酸は細胞膜を透過することが知られている。その他にも、脂質二重膜中のリン脂質に含有

され、再度放出される経路や細胞膜上に存在する脂肪酸トランスポーターから取り込まれる経路が存在する⁷⁰⁻⁷⁴⁾。一方で、脂肪酸の放出メカニズムに関しては、トランスポーターを介している可能性が示唆されているものの、その詳細に関しては未だ不明な点が多い。Bravo らの検討から、生体内で作用する脂肪酸の濃度は μM オーダーであることが報告されているが⁷⁵⁾、今回の検討で得られたのは nM オーダーであった。しかしながら、今回の検討は *in vitro* 条件での検討であったため、生体内で同様の変化が起こっているかは、実際にマウスを用いての検討が必要になる。

LPS 処置後にアストロサイト内の脂肪酸が増加したメカニズムとしては、トランスポーターを介した脂肪酸の取り込み能の増加、あるいはアストロサイト細胞膜に含まれるリン脂質からの脂肪酸放出の 2 つが考えられる。生体に最も多く存在している脂肪酸は、飽和脂肪酸である palmitic acid および stearic acid であるが、脳の細胞膜には DHA および arachidonic acid などの不飽和脂肪酸が豊富に含まれている。炎症が惹起されると、リン脂質中に含まれる arachidonic acid は、phospholipase によって加水分解を受け、細胞内に放出され、arachidonate cascade の出発物質として機能する⁷⁶⁾。アストロサイト中の遊離脂肪酸の測定結果において、各遊離脂肪酸が有意に増加していたことから、細胞外の脂肪酸の増加は、細胞内における脂肪酸濃度の変化と関連している可能性が考えられる。そこで、脂肪酸の切り出しに関わる phospholipase の発現について検討を行った。24 時間の LPS 処置は cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂)、calcium-independent phospholipase A₂ (iPLA₂) の mRNA を有意に増加させた。アストロサイトの phospholipase は、酸化ストレスや炎症反応などに応答し、発現が増加することが知られている^{77,78)}。Arachidonic acid および DHA はいずれもリン脂質の sn-2 位に結合していることが知られており、それぞれ cPLA₂ および iPLA₂ によって加水分解を受け、切り出される⁷⁸⁻⁸⁰⁾。以上の検討および報告から、LPS 処置によって誘導されたアストロサイト内の脂肪酸増加は phospholipase の発現増加を介している可能性がある。Phospholipase によって遊離型となった脂肪酸は、再度リン脂質に取り込まれる他、ミトコンドリアでのエネルギー産生などに用いられることが考えられるが、今回放出が認められた DHA は、脂肪酸受容体である GPR40/FFAR1 のリガンドとして機能することも知られている⁸¹⁾。先行研究において、炎症性疼痛下の脳内 DHA 増加にはアストロサイトの発現変化が伴うことを見出している²⁵⁾。以上から、アストロサイトは病態下に脳内の脂肪酸の環境を調節することで、間接的に脂肪酸受容体の制御に関連することが考えられる。

以上第二章において、病態下における脳内の脂肪酸環境の変化には、反応性アストロサイトが関与することを示した。アストロサイトは、慢性疼痛やうつ病のみならず多くの中枢性疾患の発症および病態制御において重要な役割を果たしていることが報告されている^{61,72,82-84)}。また近年、実験手法が進歩し、脳の部位特異的さらにはアストロサイト特異的な遺伝子の発現操作が可能となったことで、病態ごとにアストロサイトの機能が異なることも報告されている。脳内のアストロサイトを介した脂肪酸環境制御メカニズムの解明によ

って、慢性疼痛や情動機能異常などの病態下における脂肪酸およびその受容体を介したシグナル制御機構の詳細が明らかになることが期待される。

第三章 ストレス誘導性慢性疼痛形成時における脳内リン脂質の解析

3-1. 緒 言

第一章において、GPR40/FFAR1 シグナルが情動機能の制御を担うこと、また、第二章においては、疼痛時における脳内の脂質環境の制御には、アストロサイトが関連することを示した。

不安や抑うつは、慢性疼痛患者に多くみられる負の感情である。近年、強制水泳ストレスに暴露されたラットを用いて神経障害疼痛モデルを作製すると、ストレスに暴露していないラットと比較して、機械的痛覚過敏が増大すると報告されている⁸⁵⁾。さらに臨床においては、術前に不安症状の強い患者において術後痛が持続することや、うつ病罹患患者においては慢性疼痛の発症率が高いことが示されており、情動機能異常は痛みの重症および慢性化に関連する可能性が示唆されている⁸⁶⁻⁸⁸⁾。しかしながら、情動機能異常を含めたストレス暴露によって生じる慢性疼痛の形成機序は依然として不明な点が多い。

リン脂質は脳における脂質の大半を占めており、細胞の形態維持や神経軸索周囲を取り囲む髄鞘の形成を担う。その構造中にはエステル結合を介して 2 つの脂肪酸が結合しており、加水分解酵素である phospholipase によって切断され、脂肪酸が遊離する⁸⁹⁻⁹¹⁾。そのため、生体内における脂肪酸供給源の一つであると考えられている。統合失調症、うつ病や神経障害性疼痛においては、赤血球や血清、前頭皮質、脊髄後角のリン脂質が変動することが報告されている^{28,92,93)}。さらに、これらの病態下では血中の脂肪酸、中でも n-3 系脂肪酸である DHA が減少していることも示されている^{53,94,95)}。即ち、病態下におけるリン脂質の減少に伴う脳内脂質環境の変化が GPR40/FFAR1 シグナルの破綻につながる可能性が考えられる。

よって、第三章では、反復ストレス暴露誘導性慢性疼痛モデルマウスを作製し、脳内リン脂質の局在解析を行った。

本章の研究内容の一部は、下記の論文として公表した。

1. Aizawa F, Nakamoto K, Tokuyama S. The involvement of free fatty acid-GPR40/FFAR1 signaling in chronic social defeat stress-induced pain prolongation in C57BL/6J male mice. *Psychopharmacology*, **235**, 2335-2347 (2018)
2. Aizawa F, Sato S, Yamazaki F, Yao I, Yamashita T, Nakamoto K, Kasuya F, Setou M, Tokuyama S. N-3 fatty acids modulate repeated stress-evoked pain chronicity. *Brain Res.* (in press)

3-2. 実験材料および方法

3-2-1. 実験動物

C57BL/6J 系統マウス (雄性、8 週齢) および ICR 系統マウス (雄性、5 週齢) は日本 SLC 株式会社から購入した。C57BL/6J および ICR 系統マウスは、個別にハンドリングを行った後、温度 24°C、湿度 55 ± 5% の環境下において明暗サイクルが 12 時間 (AM 8:00 点灯、PM 8:00 消灯) の室内にて単独飼育した。なお、固形飼料 (オリエンタル酵母) および水は自由に摂取させた。全ての実験は、日本薬理学会が策定する動物実験に関する指針に従い、また、神戸学院大学動物委員会の承認を得て行った (承認番号: A15-12、16-10、17-10、18-03)。

3-2-2. 実験および行動試験スケジュール

反復ストレス暴露および各種行動解析は Fig. 10 のスケジュールに従って行った。反復ストレス暴露後の情動評価として、Cohort 1 では社会性相互作用試験およびオープンフィールド試験を行った。Cohort 2 では社会性相互作用試験および高架式十字迷路試験を行った。

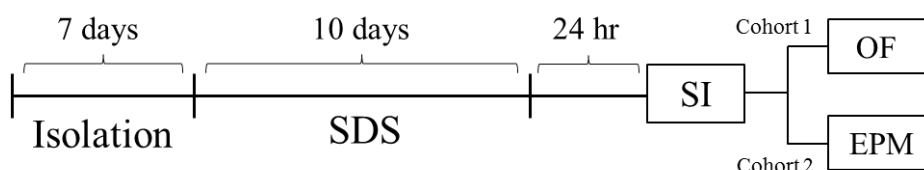


Fig. 10. Experimental schedule for making repeated stress induced-chronic pain model mice.

SDS, social defeat stress; SI, social interaction test; EPM, elevated plus-maze test; OF, open field test

3-2-3. 社会的敗北ストレス (SDS) における Resident マウスの作製

Resident マウスは、ICR マウスを用いて Berton らの報告^{37,96)}をもとに作製した。3 週間程度単独飼育を行った ICR マウス (8 週齢) は、週齢・体重が同程度の雄性 ICR マウスと同じケージに入れ、アクリル板でケージを 2 つに間仕切り、直接接触ができない条件にて 3 日間飼育した。アクリル板は、透明なものを使用し、複数の小孔を開けることで、音・匂い等の感覚情報が得られるようにした。3 日後アクリル板を除き、各 ICR マウスの攻撃性 (攻撃開始 < 30 秒) を 1 日 1 回 (PM 5:00 以降)、3 日間連続して評価した。3 日間の評価期間終了後、ICR マウスは再度単独飼育を維持した。SDS に用いる個体は、試験に使用する C57BL/6J マウスとは異なる新規 C57BL/6J マウスに対する攻撃性を、上述と同条件で 3 日間連続評価し、より攻撃性が高い ICR マウスを無作為に抽出した。

3-2-4. SDS

Intruder として用いる C57BL/6J マウスは試験 1 週間前から単独飼育を行い、群飼育の影響を排除した。SDS は、身体的ストレスおよび感覚的ストレスを組み合わせ 10 日間連

続で行った (RSDS; repeated-SDS)。C57BL/6J マウスは、RSDS 期間中体重を測定し記録した。Fig. 11 に従い、スクリーニングによって無作為に抽出された ICR マウスのケージに C57BL/6J マウスを投入し、5 分間の身体的攻撃に暴露させた (身体的ストレス)。5 分後、身体的ストレスに暴露された同ケージを、透明で小孔の開いたアクリル板で 2 つに間仕切り、音・匂いなどの感覚情報が得られる条件で 24 時間飼育した (感覚的ストレス)。10 日間の試験中、SDS は毎日異なる ICR マウスから暴露されるようにした。情動行動は、最終の感覚的ストレス暴露から 24 時間後に各種行動試験法を用いて評価した。

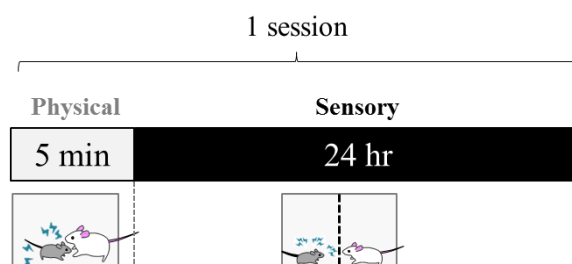


Fig. 11. Experimental schedule for exposed social defeat stress.

3-2-5. 社会性相互作用試験

RSDS 暴露によるストレス感受性の評価に用いた。社会性相互作用試験の試験条件は第一章の方法に準じて行った。試験に用いる C57BL/6 マウスは単独飼育の状態で試験 1 時間前から試験環境に順化させた。本試験は no target および target の 2 つの試験から構成される。オープンフィールドの一端に interaction 領域、その反対側の両端に corner 領域を設け、フィールドが照度 8 ± 2 lux となるように設定した。Interaction 領域に透明で小孔のある箱を置き、オープンフィールドに C57BL/6 マウスを入れ 2.5 分間自由に探索させた (no target)。C57BL/6 マウスを飼育ケージへ戻した後、interaction 領域に置いた箱の中に、週齢が同程度の雄性 ICR マウスを入れた。C57BL/6 マウスを再度フィールドへ戻し、同様に探索させた (target)。No target および target における総移動距離、interaction 領域および corner 領域における滞在時間を測定した。行動はオープンフィールド上部に設けた web カメラで撮影し、その映像を ANY-maze (ブレインサイエンス・イデア株式会社) を用いて測定・解析した。各試験終了後にオープンフィールドおよび箱は水で清拭し、十分に乾燥させた。ストレス感受性は Krishnann らの報告⁹⁶⁾を元に social interaction ratio (SI ratio = time spent in interaction zone during target / time spent in interaction zone during no target) を算出し、1.0 以下をストレス感受性ありとして評価した。

3-2-6. オープンフィールド試験

オープンフィールド試験は自発運動量および不安様行動の評価に用いた。第一章の方法に準じて、社会性相互作用試験終了 1 時間後に行った。自発運動量は、試験時間中の総移動距離を、不安様行動は試験時間に対する center 領域への滞在率を算出し、評価した。

3-2-7. 高架式十字迷路試験

高架式十字迷路試験は不安様行動の評価に用いた。第一章の方法に順じて、社会性相互作用試験終了 1 時間後に行った。不安様行動は 4 本の arm の合計滞在時間に対する open arm の滞在率を算出し評価した。

3-2-8. 術後痛モデルの作製

術後痛モデルマウスは Brennan および Pogatzlai らの報告^{97,98)}を参考に作製した。Pentobarbital (65 mg/kg, i.p.) によって全身麻酔を施し処置を行った。正向反射消失を確認し、10% povidone-iodine を用いて右後肢足底部を消毒後、足底部を踵部からつま先に向けメスを用いて 5 mm 切開した。先曲ピンセットによる筋肉の引き上げを 10 回、メスによる筋肉の切開を 5 箇所にした後、6-0 ナイロンで縫合し、再度 10% povidone-iodine で消毒した (ope 群)。偽手術群 (sham 群) は、全身麻酔後、右後肢足底部に 10% povidone-iodine による消毒のみを施し作製した。

3-2-9. von Frey 試験

von Frey 試験は、機械的刺激に対する逃避反応の評価に用いた。マウスを金網 (5 × 5 mm) 上に置き、2-3 時間順化させた。機械的刺激には von Frey filament (ブレインサイエンス・イデア株式会社) を用いた。マウスの後肢腹側中心部に、単一サイズの filament をやや湾曲するまで垂直に 6 秒間押し当て、逃避反応 (後肢を振る、舐める、噛む) を観察した。この操作を 10 回繰り返し、逃避反応を示した回数を記録した。逃避反応回数の増加を機械的刺激に対する過敏性ありとして評価した。

3-2-10. MALDI-IMS 用脳組織切片作製および MALDI-IMS

術後痛惹起 7 日目における各マウスを頸椎脱臼し安楽死させた後、断頭し全脳を摘出した。全脳は速やかにドライアイスを用いて凍結し、実験に用いるまで、シリカゲルと共に -80°C にて保管した。脳組織は Cryostat (CM1850; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) を用いて、厚さ 10 μm の矢状切片とした。Phosphatidycholine (PC) シグナルの検出には、マトリックスとして 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) (50 mg/mL DHB, 20 mM potassium acetate, 70% methanol) 溶液を用いた。TM-Sprayer (HTX Technologies LLC, NC, USA) を用いて、DHB 溶液を矢状切片へ均一に噴霧した。同スライドガラス上に Bradykinin および angiotensin-II (Sigma-Aldrich) を添加し、キャリブレーションスタンダードとして使用した。切片はデシケーターを用いて乾燥させ、MALDI time-of-flight (TOF)/TOF-type instrument (355-nm Nd: YAG laser, rapifleX; Bruker Daltonics, MA, USA) を用いて測定した。各 PC はポジティブリフレクトロンモードで分析した。PC のシグナル強度は control 群の $[PC(diacyl-16:0=18:1)+K]^+$ シグナルに対する相対強度として検出した。

3-2-11. 薬物および投与スケジュール

DHA (97% ethyl ester; 備前化成株式会社、岡山、日本) は窒素置換した後、使用直前まで -80°C にて保管した。DHA は使用直前に 25 mmol/kg/mouse となるように、5% arabic acid (ナカライテスク株式会社) を含む生理食塩水に懸濁させ、各 SDS 直後に 1 日 1 回、10 日間反復経口投与した。

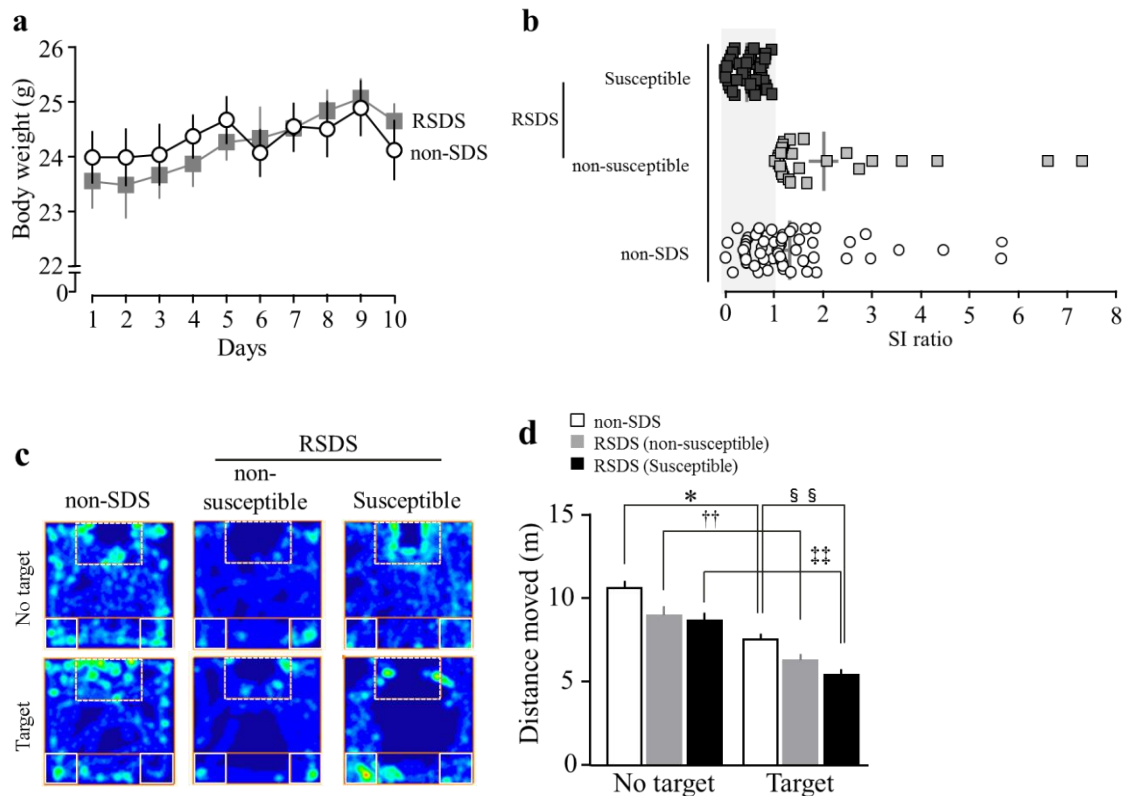
3-2-12. 統計学的処理

統計学的処理には Graph Pad Prism version 7.0 (Graphpad Software, Inc.) を用いた。2 群間の比較には、F 検定を行った後、Student's *t* test を用いて統計学的解析を行った。社会性相互作用試験および von Frey 試験は、two-way ANOVA 解析を行った後に、Bonferroni's post hoc test を用いて統計学的解析を行った。全ての結果は平均 \pm 標準誤差 (standard error of the mean; S.E.M.) として表した。有意差は、危険率 5% を基準とした。

3-3. 結 果

3-3-1. RSDS 暴露が体重および社会性行動に及ぼす影響

RSDS 暴露は、non-SDS 群と比較して体重にはなんら変化を与えなかった (Fig. 12a)。non-SDS 群および RSDS 群 (non-susceptible または susceptible) の総移動距離は、いずれにおいても no target と比較して、target において有意に減少した (Fig. 12d)。社会性相互作用試験において、non-SDS 群の target における interaction 領域の滞在時間は、no target と比較して有意に延長した。一方で RSDS 群 (susceptible) の target における interaction 領域の滞在時間は、no target と比較して有意に短縮した。また、target における interaction 領域の滞在時間は、non-SDS 群と比較して、RSDS 群 (susceptible) において有意に短縮した。RSDS 群 (non-susceptible) における interaction 領域の滞在時間は target および no target いずれも変化を示さなかった (Fig. 12b, c, e)。RSDS 群 (susceptible) の target における corner 領域の滞在時間は、no target と比較して有意に延長した。また、RSDS 群 (susceptible) の target における corner 領域の滞在時間は、non-SDS 群の target と比較して有意に延長した (Fig. 12f)。



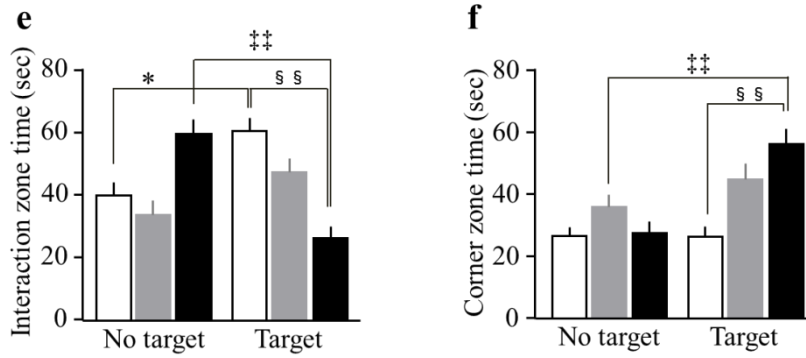


Fig. 12. Repeated-SDS (RSDS) induced decrease social behavior in mice.

a. The time dependent changes in body weight during RSDS.

(non-SDS = 6, RSDS = 6).

b. The profile of SI ratio at completed RSDS. Gray area represents susceptible (low social behavior).

c. Represented moving plots between three groups of mice both no target and target session in SI. White dots square represents interaction zone. White solid square represents corner zone.

d. The total distance moved during each session in SI.

A two-way analysis of variance followed by Bonferroni's post hoc test in the difference of distance (target \times RSDS: $F_{2,204} = 0.2063$, $P = 0.8138$, target: $F_{1,204} = 70.44$, $P < 0.0001$, RSDS: $F_{2,204} = 11.68$, $P < 0.0001$).

e. Time spent in interaction zone both no target and target session in SI test.

A two-way analysis of variance followed by Bonferroni's post hoc test in the difference of interaction (target \times RSDS: $F_{2,204} = 22.07$, $P < 0.0001$, target: $F_{1,204} = 0.01589$, $P = 0.8998$, RSDS: $F_{2,204} = 2.736$, $P = 0.0672$).

f. Time spent in two-corner zone both no target and target session in SI test.

A two-way analysis of variance followed by Bonferroni's post hoc test in the difference of distance (target \times RSDS: $F_{2,204} = 6.106$, $P = 0.0027$, target: $F_{1,204} = 12.67$, $P = 0.0005$, RSDS: $F_{2,204} = 7.870$, $P = 0.0005$).

(non-SDS = 61, RSDS (non-susceptible) = 29, RSDS (susceptible) = 43)

* $P < 0.05$, vs. non-SDS (no target), $^{\dagger\dagger}P < 0.01$, vs. RSDS (non-susceptible)(no target), $^{**}P < 0.01$, vs. RSDS (susceptible)(no target), $^{§§}P < 0.01$, vs. RSDS (susceptible)(target).

SI, social interaction

Data are presented as mean \pm S.E.M.

3-3-2. RSDS 暴露が不安様行動に及ぼす影響

オープンフィールド試験において、RSDS 群の総移動距離は、non-SDS 群と比較して有意に減少した (Fig. 13b)。RSDS 群の center 領域への滞在時間は、non-SDS 群と比較して有意に減少した (Fig. 13a, c)。RSDS 群の peripheral 領域への滞在時間は、non-SDS 群と比較して有意に増加した (Fig. 13a, d)。高架式十字迷路試験において、RSDS 群の open arm への侵入率は、non-SDS 群と比較して有意に減少した (Fig. 13e, f)。さらに RSDS 群の open arm への滞在時間は、non-SDS 群と比較して有意に短縮した (Fig. 13e, g)。

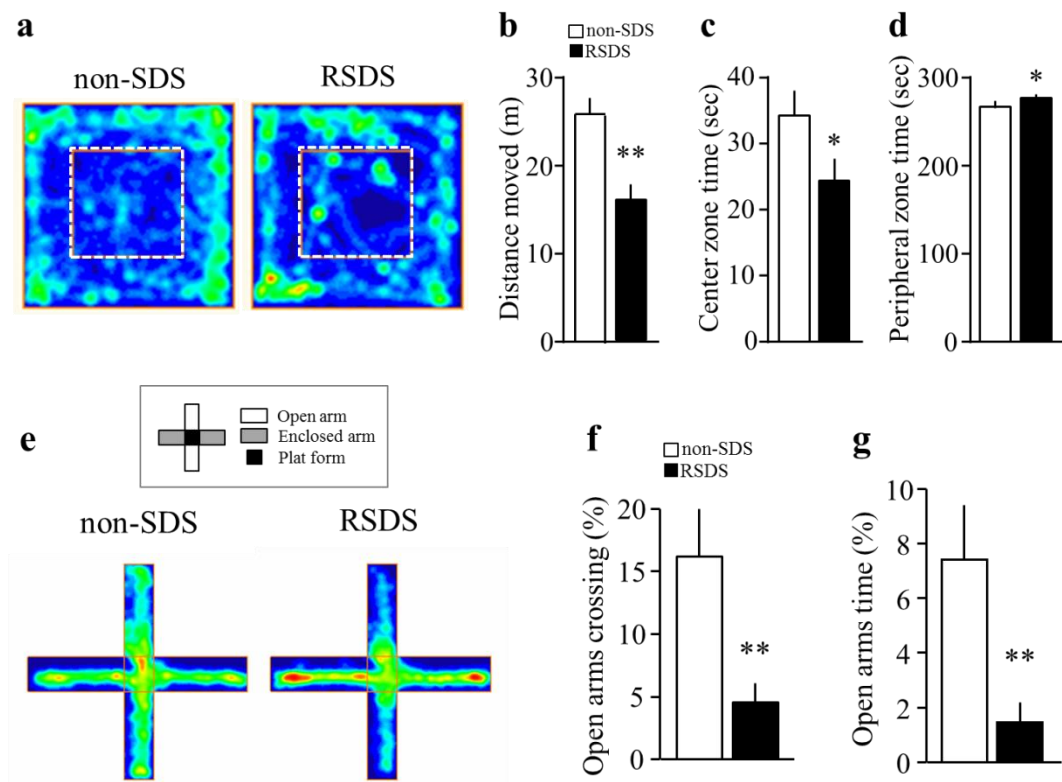


Fig. 13. RSDS induced anxiety-like behavior in OF and EPM.

a. Represented moving plots of both non-SDS and RSDS mice in OF. White dots square represent center zone.

b. The total distance moved during experiment in OF.

c. The time spent in center zone.

d. The time spent in peripheral zone.

(non-SDS = 18, SDS = 18).

e. Represented moving plots of both non-SDS and RSDS mice in EPM.

f. The ratio of open arms entries.

g. The ratio of time spent in open arms.

(non-SDS = 11, RSDS = 19).

Statistical comparisons are performed using unpaired-Student's *t* test; **P* < 0.05, ***P* < 0.01, vs. non-SDS.

OF, open field test; EPM, elevated plus-maze test

Data are presented as mean±S.E.M.

3-3-3. RSDS 暴露が術後痛処置によって生じる機械的痛覚過敏に及ぼす影響

von Frey 試験において、sham 処置をした non-SDS 群および RSDS 群の機械的痛覚過敏性は、術後痛惹起同側および反対側いずれにおいても baseline と同程度であった。non-SDS 群の術後痛惹起同側において、機械的痛覚過敏は、non-SDS/sham 群と比較して術後痛惹起 1 日目から有意に増加し、術後 5 日目に消失した。RSDS 群の術後痛惹起同側において、機械的痛覚過敏は、non-SDS 群と同様に術後痛惹起 1 日目から有意に増加した。RSDS 群の術後痛惹起同側における機械的痛覚過敏は、術後 21 日目まで有意に延長した (Fig. 14a)。術後痛惹起群において、non-SDS 群および RSDS 群のいずれも術後痛惹起後の反対側には何ら変化を示さなかった (Fig. 14b)。

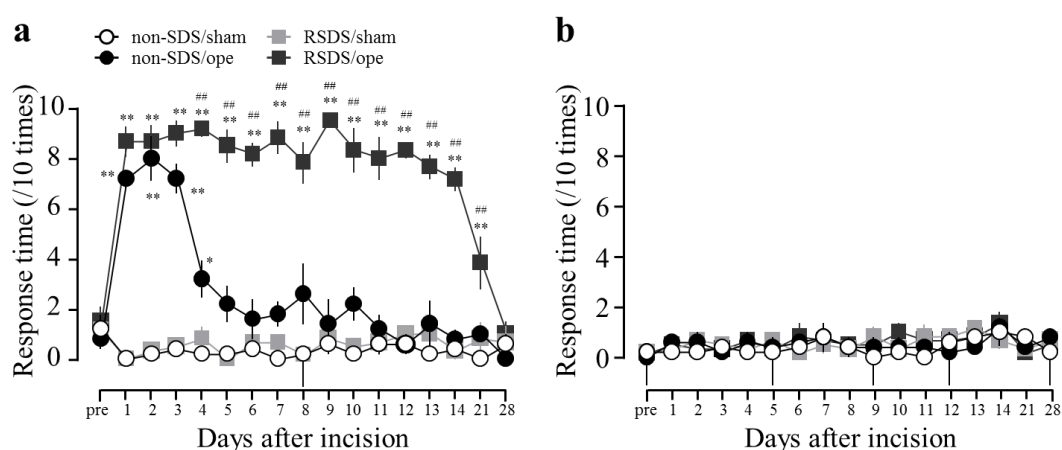


Fig. 14. RSDS induced mechanical allodynia prolongation.

a. Time dependent changes in mechanical allodynia of ipsilateral hind paw.

A two-way analysis of variance followed by Bonferroni's post hoc test in ipsilateral (time \times surgery: $F_{48,288} = 13.76$, $P < 0.01$, time: $F_{16,288} = 18.11$, $P < 0.01$, surgery: $F_{3,18} = 147.1$, $P < 0.01$)

b. Time dependent changes in mechanical allodynia of contralateral hind paw.

(non-SDS/sham = 5, non-SDS/ope = 6, RSDS/sham = 5, RSDS/ope = 6).

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. non-SDS/sham, ### $P < 0.01$, vs. non-SDS/ope

Data are presented as mean \pm S.E.M.

3-3-4. 慢性疼痛形成期における脳内リン脂質の局在解析

von Frey 試験において、non-SDS 群の術後 1 日目における機械的痛覚閾値は、sham 群と比較して、有意に低下し、術後 7 日目に消失した。一方、RSDS 群の機械的痛覚閾値も術後 1 日目において有意に低下したが、これは術後 7 日目まで有意に延長した (Fig. 15a)。Non-SDS/sham 群において、PC 16:0-16:0 および PC 16:0-20:4 は前頭前野および線条体を含む前頭部に幅広く分布していた。さらに、PC 16:0-22:6 および PC 18:1-22:6 は大脳皮質に豊富に局在していた。PC 18:0-20:4 は中脳および延髄に分布していた。PC 18:0-22:6 は小脳に豊富に存在していた。PC 18:1-20:4 は脳全体に分布していた。non-SDS/opec 群において、術後 7 日目の時点では PC 18:0-20:4 以外の PC は前頭領域において、non-SDS/sham 群と比較して減少した。一方で、RSDS 群における PC 16:0-16:0、PC 16:0-20:4、PC 16:0-22:6、および PC 18:1-22:6 は non-SDS 群と比較して、海馬および前頭皮質において減少した。RSDS 群において PC 18:0-C20:4 は中脳および延髄で、PC 18:1-20:4 は全脳で減少した。さらに、RSDS 群における PC 18:0-22:6、PC 18:1-22:6 は視床下部において減少した。さらに、RSDS 群において、全ての PC は sham 群と比較して、術後痛処置によってさらに減少した (Fig. 15b)。

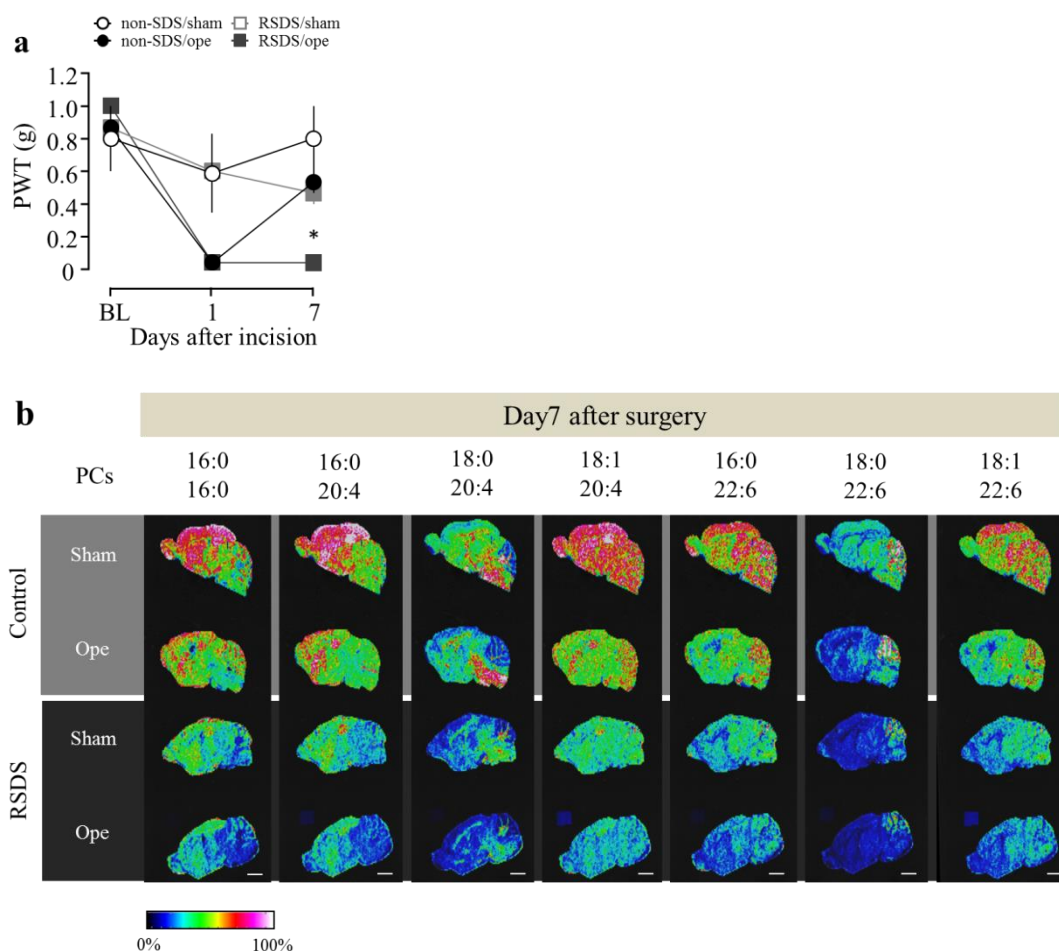


Fig. 15. RSDS induced alteration of PCs in the brain.

a. The time dependent changes in paw withdrawal threshold in ipsilateral hind paw.

(non-SDS/sham = 6, non-SDS/ope = 6, SDS/sham = 6, SDS/ope = 5).

A two-way analysis of variance followed by Bonferroni's post hoc test in ipsilateral (time \times surgery: $F_{6,24} = 4.139$, $P = 0.0054$, time: $F_{2,24} = 22.70$, $P < 0.0001$, surgery: $F_{3,24} = 5.367$, $P < 0.0057$).

* $P < 0.05$, vs. non-SDS/sham

b. Representative PCs distribution in the sagittal brain section. Color represents signal intensity as percentage in mass spectrum. All groups were measured through three sections. Scale bar: 2 mm.

16:0, palmitic acid; 18:0, stearic acid; 18:1, oleic acid; 20:4, arachidonic acid; 22:6, DHA; PC, phosphatidylcholine

Data are presented as mean \pm S.E.M.

3-3-5. DHA 反復投与が RSDS 暴露後の不安様行動および RSDS 誘導性慢性疼痛形成に及ぼす影響

DHA は RSDS 期間中のいずれにおいても、vehicle 群と比較して体重にはなんら変化を与えなかった (Fig. 16a)。高架式十字迷路試験において、DHA 投与群の open arm への侵入率は、vehicle 群と比較して有意に増加した (Fig. 16b, c)。さらに DHA 群の open arm への滞在時間は、vehicle 群と比較して有意に増加した (Fig. 16b, d)。von Frey 試験において、vehicle 群および DHA 投与群いずれにおいても、術後 1 日目の機械的痛覚閾値が sham 群と比較して有意に低下した。DHA 投与群は vehicle 群と比較して術後 7 日目における機械的痛覚閾値の持続を有意に改善した (Fig. 16e)。

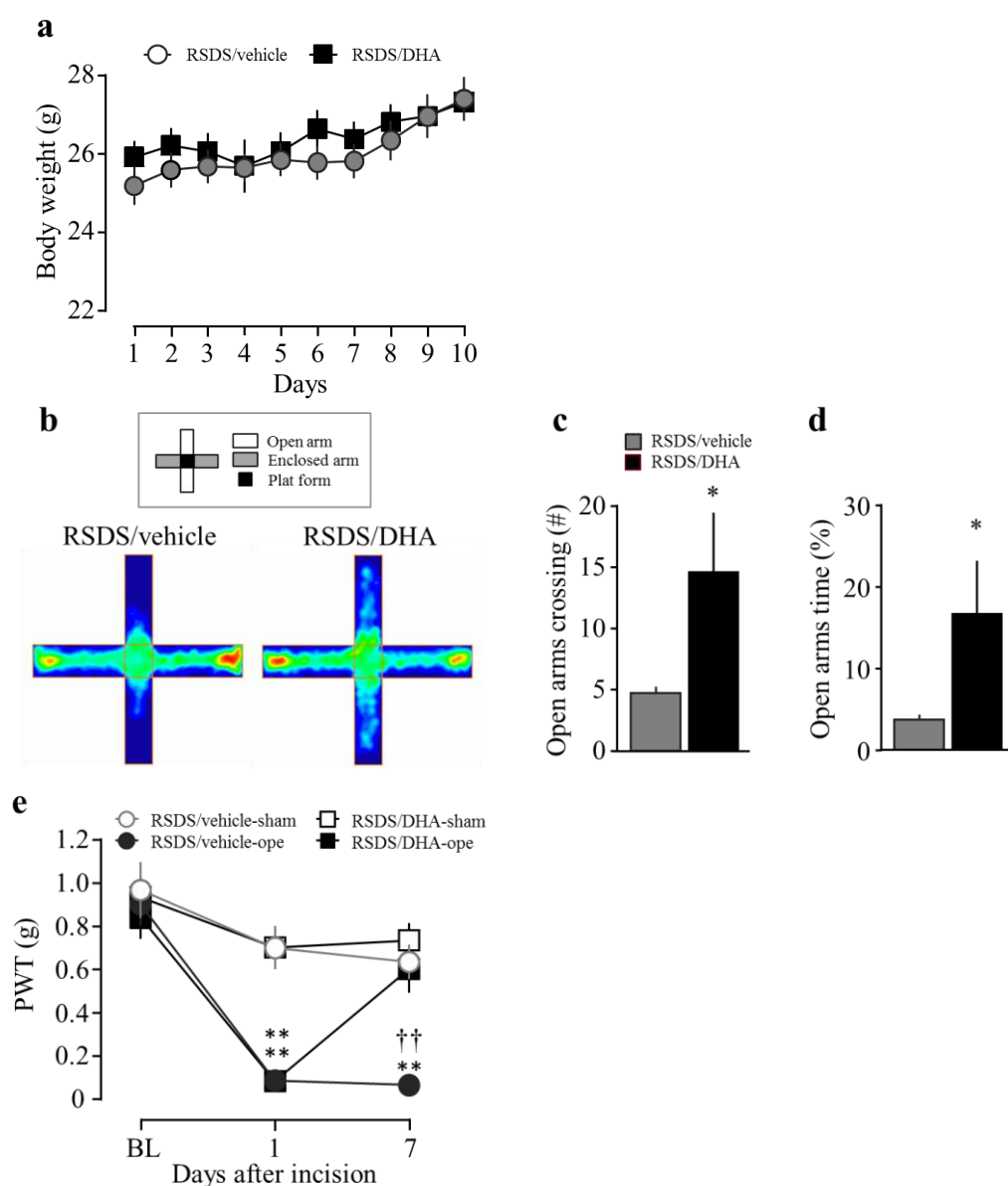


Fig. 16. The effect of DHA supplementation to anxiety-like behavior and mechanical allodynia in RSDS.

- a. The time dependent changes in body weight during expose RSDS.
- b. Represented moving plots of vehicle or DHA treated RSDS mice in EPM.
- c. The number of entries into open arms in EPM.
- d. The ratio of time spent in open arms in EPM.

(RSDS/vehicle = 12, RSDS/DHA = 11).

Statistical comparisons are performed using unpaired-Student's *t* test; **P* < 0.05 vs. RSDS/vehicle

- e. Time dependent changes in paw withdrawal thresholds of ipsilateral hind paw.

A two-way analysis of variance followed by Bonferroni's post hoc test in ipsilateral (time × drug: $F_{6,57} = 5.726$, $P = 0.0001$, time: $F_{2,57} = 39.95$, $P < 0.0001$, diet: $F_{3,57} = 18.85$, $P < 0.0001$) ***P* < 0.01 vs. RSDS/vehicle-sham,

††*P* < 0.01 vs. RSDS/vehicle-ope

(RSDS/vehicle-sham = 6, RSDS/vehicle-ope = 6, RSDS/DHA-sham = 6, RSDS/DHA-ope = 5).

Data are presented as mean±S.E.M.

3-4. 考 察

第三章では、痛みの慢性化に対する情動機能障害の影響を明らかにするために、反復ストレス暴露モデルを用いた慢性疼痛モデルマウスの作製を行い、さらに脳の脂質動態について検討した。

RSDS は 1-5 日間の暴露では情動機能変化が認められないが、10 日間程度継続して暴露することで社会性の低下や抑うつ、不安様行動が認められる。そのため、RSDS 暴露モデルは、心的外傷後ストレス障害やうつ病などのストレス関連疾患の病態解析に用いられている。実際に、うつ病患者では海馬の神経新生能が低下している可能性が示唆されているが、SDS 暴露モデルマウスにおいても同様に海馬の神経新生低下が報告されている。以上のことから、RSDS マウスは、臨床のうつ病病態に類似した情動機能異常を呈したモデルであるととらえられている。Berton および Krishnan らによって、RSDS に暴露されたマウスの行動はストレス脆弱性 (susceptible) とストレス抵抗性 (non-susceptible) の 2 つグループに分かれることが報告されている^{37,96)}。そこでまず、これらの報告に従い RSDS 暴露によって、社会性行動の低下が認められるかを検討した。non-SDS 群は target において interaction 領域の滞在時間が増加、即ち社会性行動を示したのに対し、susceptible 群は社会性が有意に低下した。しかしながら、non-susceptible ではこれらの変化は認められなかった。Non-susceptible マウスにおいては、社会性行動の低下が認められないが、不安様行動については susceptible と同様の結果が得られることが報告されている⁹⁶⁾。そこで、オープンフィールド試験と高架式十字迷路試験を用いて不安様行動を解析した。いずれの試験においても RSDS の暴露によって不安様行動が増加した。ストレス脆弱性による各種情動行動の違いとしては、海馬以外にも、情動の制御に関連する前頭前野におけるヒストンのアセチル化の亢進、即ちエピジェネティックな変化が関与する可能性が示唆されている⁹⁹⁾。また、幼少期に母親から隔離する母子分離ストレスモデルマウスにおいても前頭前野において同様の変化が報告されている¹⁰⁰⁾。RSDS 暴露に伴う不安様行動の責任脳領域の特定に関してはさらに詳細な検討が必要である。

不安や抑うつ症状は、慢性疼痛患者の約半数以上に認められるとの知見がある⁸⁶⁾。RSDS 暴露マウスも同様の症状を示したことから、次に、RSDS 暴露マウスを用いて術後痛モデルを作製し、痛みの慢性化について評価を行った。術後痛は Brennan および Pogatzki によってラットおよびマウスで作製された疼痛モデルである^{97,98)}。ヒトにおいて術後痛は、創傷部の治癒と共に回復する。また、マウスにおいても、ストレス非暴露条件においては、術後痛処置後の機械的痛覚過敏は、1 週間以内に消失することが報告されている¹⁰¹⁾。国際疼痛学会によって、慢性疼痛は「治療に必要な期間を超えて持続する痛み」と表現されている¹⁾。そこで、機械的痛覚過敏を経日的に検討し、痛みの持続期間を測定することで、痛みの慢性化について検討した。RSDS 群においては、通常、機械的痛覚過敏が消失する術後 1 週間の時点においても機械的痛覚過敏の増加、即ち疼痛行動の延長が認められた。また、RSDS 群における機械的痛覚過敏の増加は、約 3 週間にわたって持続した。以上の結果が

ら、ストレスの暴露によって情動機能異常が誘導されるとともに、痛みの慢性化が生じることが示された。ラットを用いた検討において、強制水泳ストレスに暴露した後では GABA_A 受容体の活性化抑制を介した機械的痛覚過敏が生じることが報告されている¹⁰²⁾。また、ストレス後に生じる炎症亢進が痛覚過敏に関連しているという知見もある¹⁰³⁾。しかしながら、これらはいずれも痛みを上行性に伝達する脊髄における変化であり、情動および痛みを最終的に認知・制御する脳における検討はほとんどなされていない。マウスにおいて RSDS の暴露は、情動に関連する前帯状皮質の活性化を誘導することが報告されている。また、その他の脳領域においても神経活動の変化が生じていることが示されている^{104,105)}ことから、RSDS 暴露によって生じる脳の器質的变化が痛みの神経伝達経路に影響を及ぼしている可能性がある。脳はその乾燥重量のおよそ半分が脂質で構成されている。脳における脂質の組成および量的な変化は、うつ病や統合失調症を含めた情動機能異常、および慢性疼痛の病態形成と関連していると示唆されている^{29,106)}。しかしながら、これら脂質変化が脳のどの領域で生じているかは明らかではなかった。脳内の脂質の多くは細胞膜構成成分であるグリセロリン脂質が占めている。そこで、ストレス誘導性慢性疼痛モデルマウスを用いて、慢性疼痛下の脳においてグリセロリン脂質である PC の局在解析を行った。今回の検討から、無処置のマウスでは、飽和脂肪酸である palmitic acid (C16:0) を含んだ PC 16:0-16:0 および PC 16:0-20:4 は前頭前野に豊富に存在していた。また、DHA 含有 PC は皮質、中脳、延髄や橋に豊富に含まれていた。しかしながら、RSDS 暴露マウスにおいては、いずれの脳領域においてもこれら PC は減少していた。また、術後痛惹起 7 日目の RSDS 群の PC は、RSDS 暴露単独群および non-SDS 群と比較して、さらなる減少が認められた。前頭前野や中脳に発現する dopamine 作動性神経、serotonin 作動性神経、noradrenalin 作動性神経は特に情動機能の制御に重要な役割を果たしている。また、中脳や延髄には、内因性疼痛制御機構の一部である下行性疼痛抑制系が存在しており、痛みの制御も担っている。先行研究において、強制水泳ストレス暴露後には、抑うつ様行動の発現と共に、海馬において DHA が減少することを報告している³²⁾。臨床では、慢性疼痛患者の DHA およびその代謝物は減少していること、また、長期的に DHA あるいは EPA を摂取することによって痛みが軽減することが知られている^{17,19,53,107)}。今回の PC 解析においても、DHA 含有 PC は RSDS 暴露によって減少した。そこで、RSDS 暴露期間中に DHA を反復投与し、情動行動および疼痛行動の持続が抑制されるかを検討した。DHA を反復投与したマウスでは、RSDS 暴露によって認められた不安様行動が改善した。また、DHA は RSDS 暴露によって生じる術後痛処置に伴う機械的痛覚過敏の延長を消失させた。以上の結果から、ストレス暴露後に生じた脳内のリン脂質の変動は脂肪酸の動態の変化、特に DHA の減少を介した不安様行動の発現、ならびにその後に生じる慢性疼痛の形成と関連していると考えられる。しかしながら、生体の脂質は臓器や動物種によって異なることが報告されている他、神経細胞や赤血球などの細胞種によっても異なることが報告されている¹⁰⁸⁾。今回の検討は脳組織の網羅的解析であったため、病態特異的な分子種が存在するかは、

さらに、部位・細胞種や脂質の分子種を特定した詳細な解析が必要となる。

第三章において、長期的なストレスへの暴露が慢性疼痛の形成に関与することが明らかとなった。さらに、慢性疼痛病態下においては、脳内の脂肪酸供給源のひとつである PCs の局在が著明に変化していることが見出され、慢性疼痛患者で生じる生体内の脂肪酸動態変化に関連している可能性が示された。ストレス暴露によって生じるこれら脳内の脂質動態あるいは、その下流に存在するシグナルを制御するメカニズムの解明によって痛みの慢性化を抑制できることが期待される。

第四章 ストレス誘導性慢性疼痛形成機序における DHA—GPR40/FFAR1 シグナル機構の関与

4-1. 緒 言

第三章において、ストレスの反復暴露によって機械的痛覚過敏が延長する、即ち、痛みが慢性化することを示した。加えて、ストレスへの反復暴露ならびにストレス誘導性慢性疼痛下では、脳内のリン脂質動態が変動していることが明らかとなった。しかしながら、これら脳内の脂質環境の変化がどのようにストレス誘導性慢性疼痛の形成に関与しているかは不明である。

Docosahexaenoic acid (DHA) は n-3 系脂肪酸に分類される多価不飽和脂肪酸である¹⁹⁾。生体内では、細胞膜の形成や神経新生などに必須の成分として知られている。DHA は palmitic acid の炭素鎖の伸長および不飽和化によって合成することができるが、動物では、この過程に必要な酵素である $\Delta 12$ -desaturase および $\Delta 3$ -desaturase が欠損している¹⁰⁹⁾。この経路とは別に、 α -linolenic acid を出発物質として増炭反応および不飽和化を行い DHA を合成する経路が知られているがこの反応によって得られる DHA は微量である。そのため、魚等 DHA を豊富に含む食品を摂取することによって生体機能維持に必要な量を補っている。多くの臨床研究から DHA は、心血管疾患、統合失調症の軽減作用を有していることが示されている他、近年では、炎症性腸疾患や神経障害性疼痛、うつ病などにもその有益性が報告されている^{16,17,110–112)}。慢性疼痛患者においては、血中の n-3 系脂肪酸が減少しているとの報告があり⁵³⁾、生体内における DHA 減少は、慢性疼痛の病態形成機序に密接に関与している可能性がある。また我々は、各種疼痛モデルマウスを用いた検討から DHA が抗侵害作用を有すること、この機序には、DHA の標的受容体の一つとして知られる GPR40/FFAR1 の活性化を介した内因性疼痛制御機構の賦活化が関与することを見出している^{101,113)}。以上のことから、脳内の DHA—GPR40/FFAR1 シグナル機構の機能低下が、ストレス誘導性慢性疼痛形成に関与する可能性が示唆される。

第四章では、n-3 系脂肪酸欠乏マウスを作製し、DHA の減少がストレス誘導性慢性疼痛機序に及ぼす影響について検討した。さらに、その標的受容体である GPR40/FFAR1 シグナルの関与についても検討を加えた。

本章の研究内容の一部は、下記の論文として公表した。

1. [Aizawa F](#), Sato S, Yamazaki F, Yao I, Yamashita T, Nakamoto K, Kasuya F, Setou M, Tokuyama S. N-3 fatty acids modulate repeated stress-evoked pain chronicity. *Brain Res.* (in press)

4-2. 実験材料および方法

第三章 (3-2) と同様の実験動物および方法に従い RSDS 暴露を行った後、モデルマウスを作製した。全ての実験は、日本薬理学会が策定する動物実験に関する指針に従い、また、神戸学院大学動物委員会の承認を得て行った (承認番号: A18-03, A17-10)。

4-2-1. 食餌誘導性 n-3 系脂肪酸欠乏マウスの作製

日本 SLC 株式会社から購入した C57BL/6J 系統マウス (雄性および雌性、8 週齢) を交配させ、雄性および雌性の第一世代マウス (3 週齢) を得た。離乳後、Table 2 に示した組成の control 食 (2.6% α -linolenic acid, 14.7% linolenic acid, 4,002 kcal, D17102001, Research Diets, Inc., NJ, USA) または n-3 系脂肪酸欠乏 (n-3 def) 食 (0% α - linolenic acid、15% linolenic acid, 4,002 kcal, D17102002, Research Diets, Inc.) を 8 週齢時まで自由摂食させ、交配用マウスを作製した (Fig. 17)。8 週齢の時点で交配を開始し、同食餌条件下において出産哺育させた。得られた仔マウスは 3 週齢時に離乳した。その後、親マウスと同食餌条件下、実験使用開始まで 4-5 匹/ケージとなるように群飼育した。

Table 2. The composition of n-3 fatty acids deficient diet.

	Control (w/w%)	n-3 deficient (w/w%)
Protein	20.3	20.3
Carbohydrate	64.0	64.0
Fat	7.0	7.0
kcal/g	4.00	4.00
<i>Ingredient</i>		
Hydrogenated Coconut Oil	54.3	56.7
Safflower Oil	12.4	13.3
Flaxseed Oil	3.3	0
Casein	200	200
L-Cystine	3	3
Corn Starch	150	150
Sucrose	130	130
Dextrose	275	275
Maltodextrin	75	75
Cellulose,	50	50
t-Butylhydroquinone	0.014	0.014
Mineral	35	35
Vitamin	10	10
Choline Bitartrate	2.5	2.5

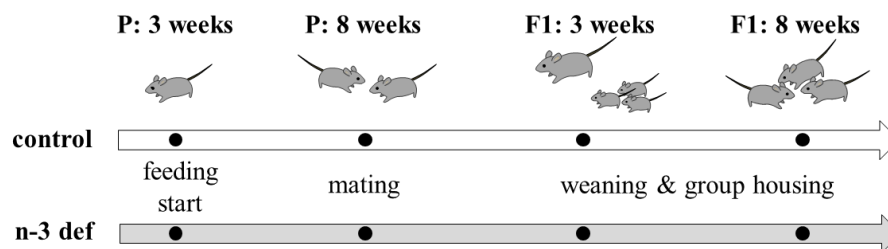


Fig. 17. The graphical methods to make n-3 fatty acids deficient mice.

P; parental mice, F1; experimental mice

4-2-2. 遊離脂肪酸量測定

脳組織湿重量を測定し、10 mM ammonium acetate buffer (pH 5.3) を加え、組織を破碎した。組織懸濁液は氷冷下 chloroform/methanol (2:1, v/v) を加え攪拌し、遠心分離 (1,300×g, 30 分) した。Chloroform 相を回収した後、沈渣を再度ホモジナイズした。遠心分離 (1,300×g, 30 分) 後、Chloroform 相を再回収し、一度目のホモジネートから得られた Chloroform 相と混合した。Chloroform 相は 10 mM ammonium acetate buffer (pH 5.3) (1:1, v/v) を加え 2 回洗浄を行った後、エバポレーターを用いて、室温で乾燥させた。これを methanol に溶解し、LC-ESI-MS/MS のサンプルとした。サンプルは Agilent 1290 Infinity LC (Agilent Technologies, CA, USA) で分離・分析した。移動相は 10 mM ammonium acetate buffer (pH 3.5)(A) 及び acetonitrile (B) を用いてグラジエント溶離した (0 min: 13% A → 8 min: 5% A → 13 min: 5% A → 15 min: 13% A)。分離カラムは CAPCELL PAK UG120 column: 1.0 mm i.d.×150 mm (資生堂、東京、日本) を使用した。脂肪酸の定量解析は QTRAP 4500 (AB SCIEX, Framingham, MA, USA) のネガティブイオンモード、selective multireaction monitoring (MRM) で分析した。-4,500 V、300°C にて試料溶液を霧状化し、-70 から -105 V 条件下で電子イオン化を行った後、-10 から -22 eV のコリジョンエネルギーでフラグメントイオンを生成させた。各種遊離脂肪酸は [M-H]⁻ から得られたプロダクトイオン (m/z 255→255: C16:0, m/z 279→279: C18:2, m/z 281→281: C18:1, m/z 283→283: C18:0, m/z 303→303: C20:4, m/z 327→327: DHA) から同定した。各遊離脂肪酸濃度は、ピーク面積から絶対検量線法を用いて算出した。

4-2-3. 実験スケジュール

Control 食および n-3 def 食マウスを用いた RSDS 誘導性慢性疼痛モデルの作製および各種行動解析は Fig. 18 のスケジュールに従って行った。

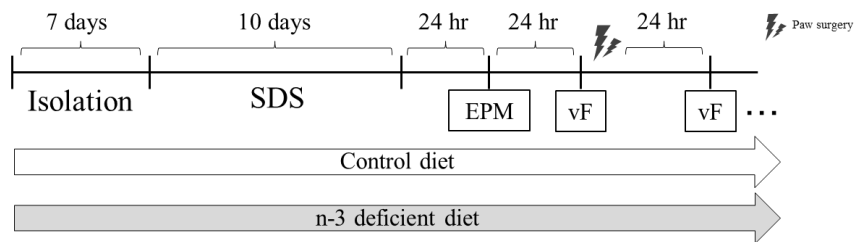


Fig. 18. The graphical methods of the making RSDS induced-chronic pain model in n-3 fatty acid deficient mice.

SDS, social defeat stress; EPM, elevated plus-maze test; vF, von Frey test

4-2-4. von Frey 試験

von Frey 試験は、機械的刺激に対する痛覚閾値変化の評価に用いた。Control 食および n-3 def 食マウスを金網 (5 × 5 mm) 上に置き、2-3 時間順化させた。機械的刺激にはサイズの異なる (0.02-2.0 g) の von Frey filament (ブレインサイエンス・イデア株式会社) を用いた。マウスの後肢腹側中心部に、filament をやや湾曲するまで垂直に 6 秒間押し当て、逃避反応 (後肢を振る、舐める、噛む) を観察した。この操作を各 filament を用いて 5 回ずつ繰り返し、3 回以上逃避反応を示した最小の filament サイズを痛覚閾値として記録した。

4-2-5. RSDS 暴露モデルマウスにおける osmotic mini-pump の移植

GPR40/FFAR1 のアンタゴニストである GW1100 (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA) は $\geq 99.9\%$ dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich) に溶解した後、使用直前に生理食塩水を用いて希釈・超音波処理し使用した (DMSO 終濃度 $< 0.4\%$)。薬物の側脳室内持続注入には osmotic infusion pump (14 days, 0.5 $\mu\text{L/hr}$) (Alzet Osmotic Pumps, Cupertino, CA, USA) を用いた (Fig. 19a)。Osmotic pump は 27-G 注射針を用いて気泡を除去しつつ、vehicle または GW1100 (1.0 $\mu\text{g}/12 \mu\text{L/day/mouse}$) で満たし、37 °C で生理食塩水に一晩インキュベーションした。Pentobarbital (65 mg/kg, i.p.) によって全身麻酔を施し、小動物用体温コントローラー (ATC-101B; ユニークメディカル、大阪、日本) およびヒーターマット (FH-100; ユニークメディカル) を用いて体温を $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に維持した。頸部皮膚を露出させ、10% povidone-iodine で消毒し 1-2 cm 切開した。切開部より滅菌鉗子を挿入し、背部皮下組織を剥離させ osmotic pump を挿入した。側脳室へ薬物を持続注入するため、osmotic pump にカテーテルおよびカニューレ (needle length: 2.5 mm) (Alzet Osmotic Pumps) を取り付け付けた。マウスの頭蓋骨を露出させ、脳定位固定装置 (SR-5M; NARISHIGE、東京、日本) およびマニピュレーターを用いて Bregma: -1.0 mm, mid-sagittal line; -1.0 mm の位置にカニューレを挿入し、歯科用セメントで固定した (Fig. 19b, c)。切開部は縫合し、ethyl-2-cyanoacrylate (東亜合成株式会社、富山、日本) にて接着後、10% povidone-iodine にて消毒し、gentamicin

sulfate を塗布した。Osmotic pump は、術後痛モデルマウス作製時に同様に全身麻酔を施した後除去した。各 osmotic pump は、風袋、挿入時、および除去時における重量を測定し、重量変化を投与量として記録した。

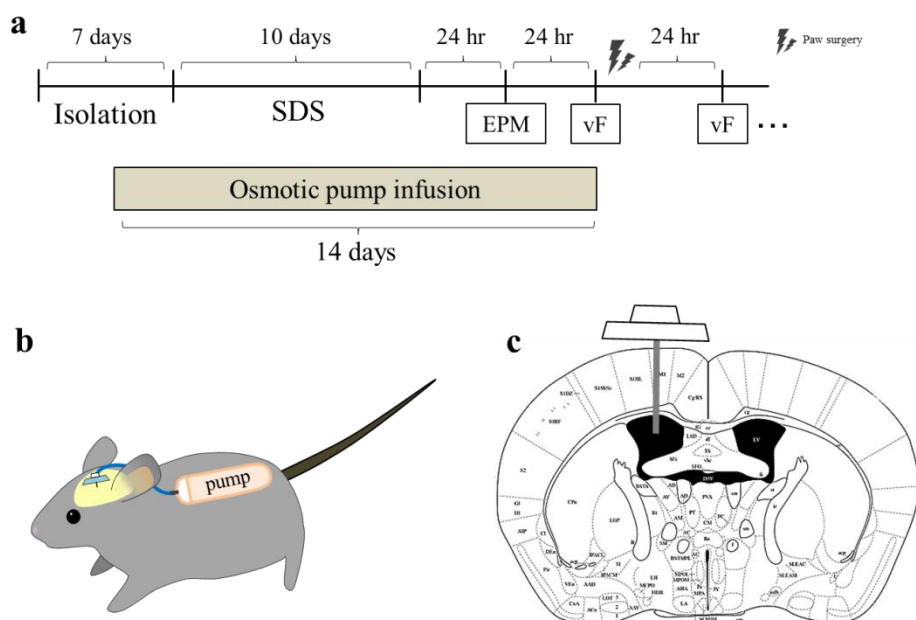


Fig. 19. The effect of continuously inhibition of GPR40/FFAR1 signaling during RSDS to social behavior.

a. Time course of implantation of osmotic-mini pump in RSDS mice.

b. Image of implantation of osmotic-mini pump with cannula into the brain..

c. The position of cannula with osmotic-mini pump into the brain (atlas from Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates 3rd Edition).

SDS, social defeat stress; EPM, elevated plus-maze test; vF, von Frey test

4-2-6. 統計学的処理

2 群間の比較には、F 検定を行った後、Student's *t* test を用いて統計学的解析を行った。von Frey 試験は、two-way ANOVA 解析を行った後に、Bonferroni's post hoc test を用いて統計学的解析を行った。全ての結果は平均 ± 標準誤差 (standard error of the mean; S.E.M.) として表した。有意差は、危険率 5% を基準とした。

4-3. 結 果

4-3-1. 食餌誘導性 n-3 系脂肪酸欠乏マウスにおける脳内脂肪酸組成解析および RSDS 暴露期間における体重変化

8 週齢時において、n-3 def 群の脳内 C22:6 は明らかな低下が認められ、その他 C16:0、C18:0、C18:1、C18:2 の脳内含量も、control 群と比較して有意に低下した (Fig. 20a)。n-3 def 群の体重は、control 群と比較して、RSDS 暴露開始時点から減少傾向を示したが有意な変化は認められなかった (Fig. 20b)。

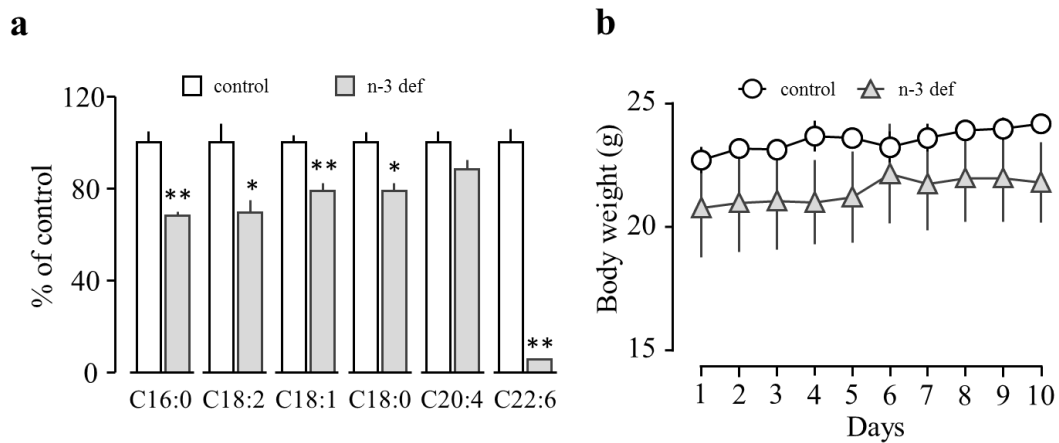


Fig. 20. Characteristic feature of diet induced n-3 fatty acid deficient mice.

a. The changes in profile of long chain fatty acids in the whole brain at 8 weeks of age.

(control = 3, n-3 def = 3).

Statistical comparisons are performed using unpaired-Student's *t* test; **P* < 0.05, ***P* < 0.01 vs. non-SDS

b. The time dependent changes in body weight during expose RSDS.

(control = 3, n-3 def = 4).

Data are presented as mean±S.E.M.

4-3-2. RSDS 暴露が食餌誘導性 n-3 系脂肪酸欠乏マウスにおける不安様行動に及ぼす影響

RSDS 後の高架式十字迷路試験において、RSDS/n-3 def 群における open arm への侵入回数は、RSDS/control 群と比較して、有意に減少した (Fig. 21a, b)。さらに、RSDS/n-3 def 群における open arm への滞在時間は RSDS/control 群と比較して、有意に短縮した (Fig. 21c)。

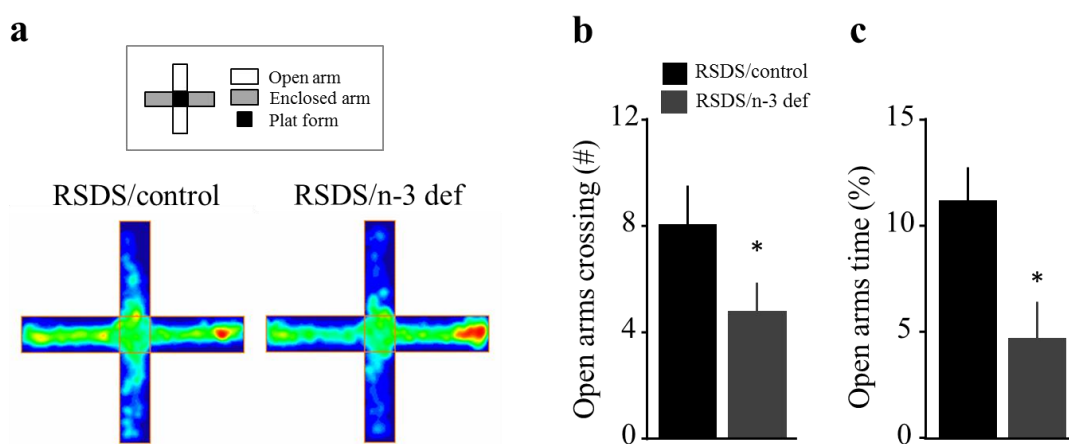


Fig. 21. n-3 deficit induced severe anxiety-like behavior in EPM.

a. Represented moving plots of control and n-3 deficient mice with RSDS in EPM.

b. The number of entries into open arms after RSDS in EPM.

c. The time spent in open arms after RSDS in EPM.

(non-SDS = 3, RSDS = 4).

Statistical comparisons are performed using unpaired-Student's *t* test; ***P* < 0.01 vs. RSDS/control

SDS, social defeat stress; EPM, elevated plus-maze test

4-3-3. RSDS 暴露が食餌誘導性 n-3 系脂肪酸欠乏マウスにおける機械的痛覚過敏に及ぼす影響

non-SDS 条件の von Frey 試験において、n-3 def 群の機械的痛覚閾値は、control 群と比較して、術後痛処置同側および反対側の baseline において有意に低下した (Fig. 22a, b)。術後 1 日目における術後痛処置同側の機械的痛覚過敏は、control 群および n-3 def 群ともに同程度であった。また、この変化は control 群では術後 7 日目で消失したのに対し、n-3 def 群では術後 7 日目においても有意に低下していた (Fig. 22a)。RSDS 条件の von Frey 試験において、n-3 def 群の機械的痛覚閾値は、control 群と比較して、術後痛惹起同側および反対側の baseline において有意に低下した (Fig. 22c, d)。さらに、術後痛惹起 1 日目の機械的痛覚過敏は、control 群および n-3 def 群ともに術後 21 日目まで持続した。しかしながら、control 群は術後 28 日目で消失したのに対し、n-3 def 群は術後 49 日目まで延長した (Fig. 22c)。

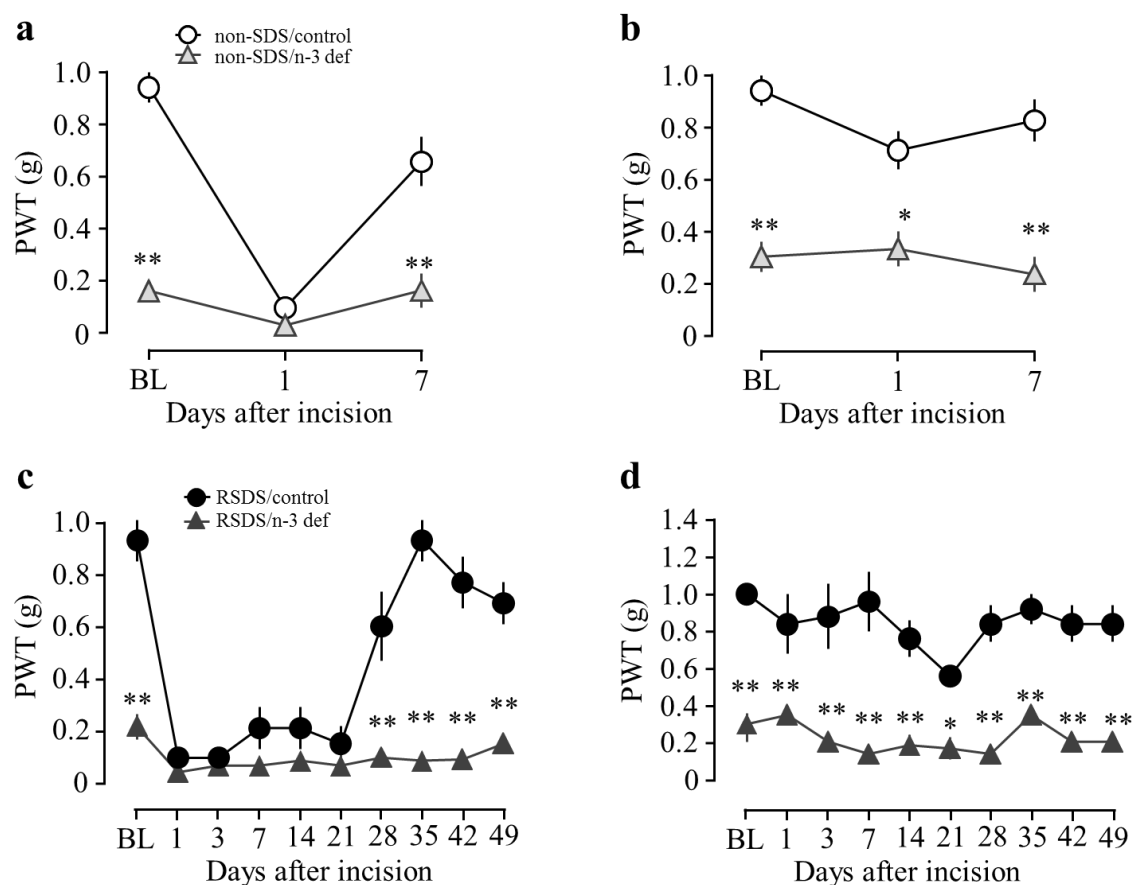


Fig. 22. The influence of RSDS to mechanical allodynia in n-3 fatty acids deficit mice.

a. Time dependent changes in mechanical allodynia of ipsilateral hind paw in non-SDS mice.

A two-way analysis of variance followed by Bonferroni's post hoc test in ipsilateral (time \times diet: $F_{2,30} = 18.52$, $P < 0.0001$, time: $F_{2,30} = 36.31$, $P < 0.0001$, diet: $F_{1,30} = 86.36$, $P < 0.0001$) $^{**}P < 0.01$ vs. non-SDS/control.

b. Time dependent changes in mechanical allodynia of contralateral hind paw in non-SDS mice.

A two-way analysis of variance followed by Bonferroni's post hoc test in contralateral (time \times diet: $F_{2,30} = 1.860$, $P = 0.1732$, time: $F_{2,30} = 1.185$, $P = 0.3196$, diet: $F_{1,30} = 85.00$, $P < 0.0001$) $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ vs. non-SDS/control.

(non-SDS/control = 7, non-SDS/n-3 def = 6).

c. Time dependent changes in mechanical allodynia of ipsilateral hind paw in RSDS mice.

A two-way analysis of variance followed by Bonferroni's post hoc test in ipsilateral (time \times diet: $F_{9,50} = 20.11$, $P < 0.0001$, time: $F_{9,50} = 26.52$, $P < 0.0001$, diet: $F_{1,50} = 181.7$, $P < 0.0001$) $^{**}P < 0.01$ vs. RSDS/control.

d. Time dependent changes in mechanical allodynia of contralateral hind paw in RSDS mice.

A two-way analysis of variance followed by Bonferroni's post hoc test in contralateral (time \times diet: $F_{9,50} = 0.9871$, $P = 0.4624$, time: $F_{9,50} = 1.089$, $P = 0.3876$, diet: $F_{1,50} = 154.4$, $P < 0.0001$) $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ vs. RSDS/control.

(RSDS/control = 3, RSDS/n-3 def = 4).

PWT, paw withdrawal threshold; BL, baseline; SDS, social defeat stress

Data are presented as mean \pm S.E.M.

4-3-4. DHA の反復投与が n-3 系脂肪酸欠乏マウスにおける RSDS 誘導性不安様行動に及ぼす影響

RSDS 暴露期間における control および n-3 def 群の体重は、DHA 投与によってなんら変化も認められなかった (Fig. 23a, b)。高架式十字迷路試験において、control および n-3 def 群いずれにおいても DHA 投与群における open arm への侵入回数は、vehicle 群と同程度であった (Fig. 23c, d, f, g)。また、DHA 投与群における open arm への滞在時間は、control および n-3 def 群いずれも vehicle 群と比較して増加傾向を示した (Fig. 23c, e, f, h)。

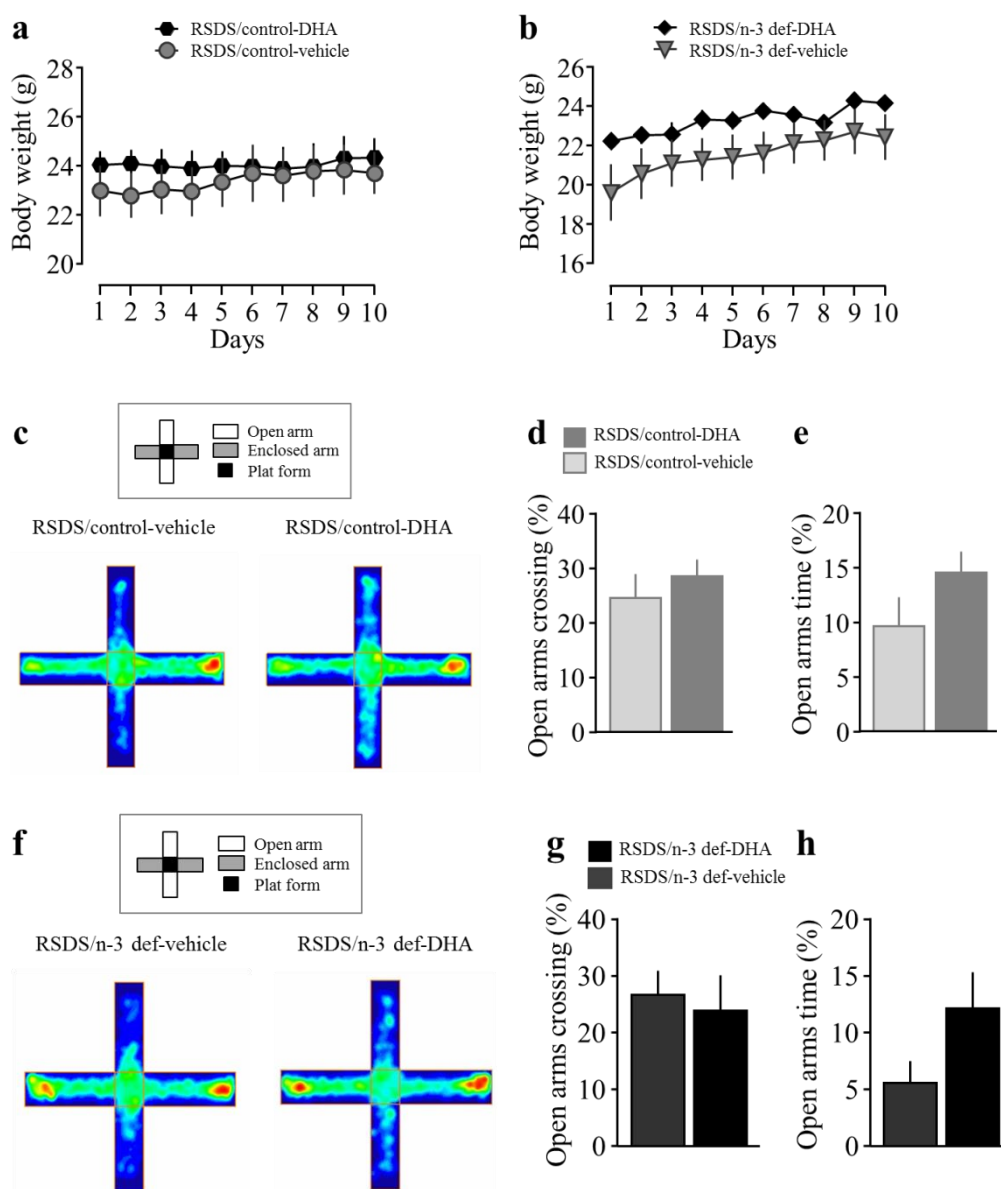


Fig. 23. The effect of DHA supplementation during RSDS to anxiety-like behavior in control and n-3 deficient diet mice.

- a. Body weight changes during RSDS in control diet mice.
- b. Body weight changes during RSDS in n-3 deficient diet mice.
- c. Represented moving plots of control diet mice with RSDS in EPM.
- d. The ratio of entries into open arms after RSDS in control diet mice.
- e. The time spent in open arms after RSDS in control diet mice.
- f. Represented moving plots of n-3 deficient diet mice with RSDS in EPM.
- g. The ratio of entries into open arms after RSDS in n-3 deficient diet mice.
- h. The time spent in open arms after RSDS in n-3 deficient diet mice.

(RSDS/control-vehicle = 7, RSDS/control-DHA = 8, RSDS/n-3 def-vehicle = 7, RSDS/n-3 def-DHA = 6).

EPM, elevated plus-maze test

Data are presented as mean±S.E.M.

4-3-5. DHA の反復投与が n-3 系脂肪酸欠乏マウスにおける RSDS 誘導性慢性疼痛に及ぼす影響

Control 食マウスの von Frey 試験において、vehicle 群では術後 1 日目に認められた機械的痛覚閾値の低下が術後 7 日目まで延長したが、DHA の投与によって有意に改善した (Fig. 24a)。術後痛処置反対側においてはなんら変化も示さなかった (Fig. 24b)。一方で、術後痛未処置の n-3 def 食マウスで認められる機械的痛覚閾値の低下は、DHA の投与によって baseline の時点で有意に改善した。また、n-3 def 食マウスにおいて、vehicle 群では術後 1 日目の機械的痛覚閾値の低下が術後 7 日目まで持続したが、DHA の投与によって有意に改善した (Fig. 24c)。DHA の反復投与は n-3 def 食マウスの術後痛処置反対側において、機械的痛覚閾値の低下を試験期間中有意に改善した (Fig. 24d)。

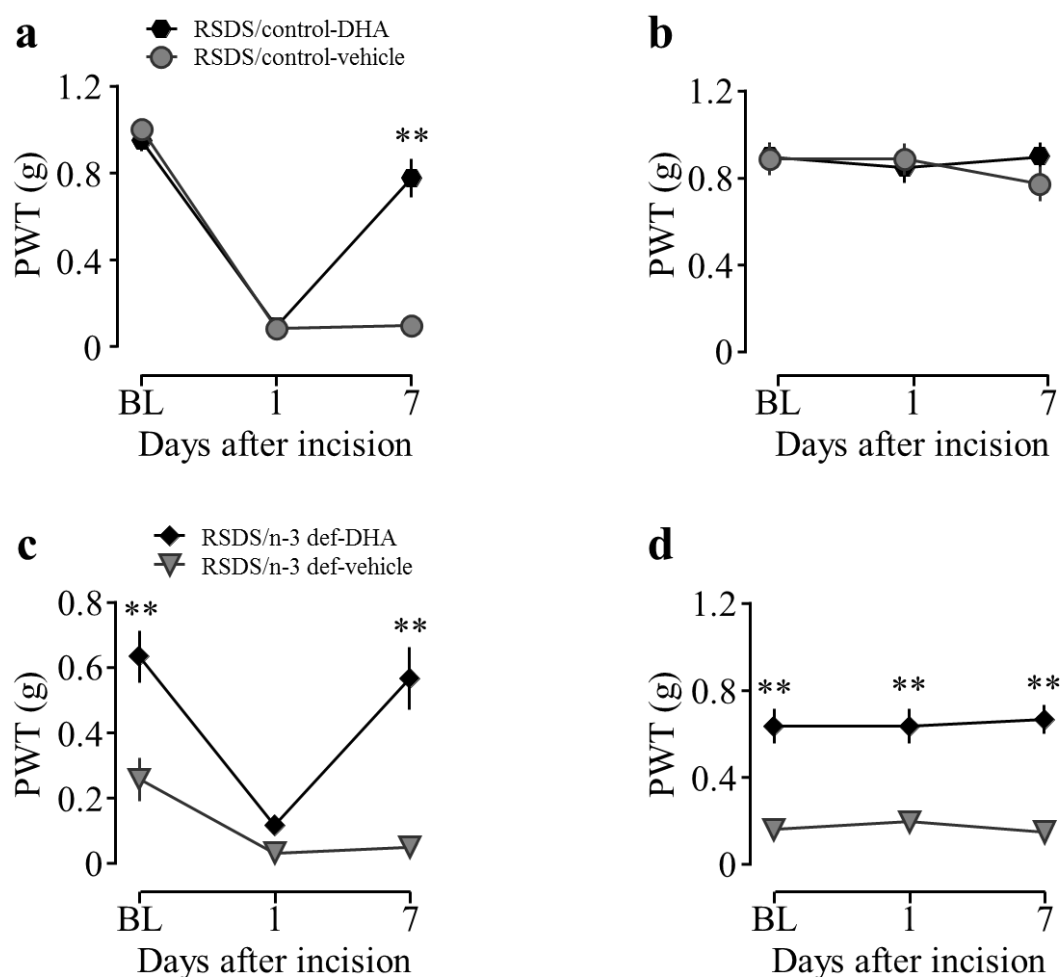


Fig. 24. The effect of DHA supplementation during RSDS to mechanical allodynia in n-3 deficient mice.

a. Time dependent changes in mechanical allodynia of ipsilateral hind paw in control diet mice.

A two-way analysis of variance followed by Bonferroni's post hoc test in ipsilateral (time \times drug: $F_{2, 26} = 48.88$, $P < 0.0001$, time: $F_{2, 26} = 238.3$, $P < 0.0001$, drug: $F_{1, 13} = 23.59$, $P = 0.0003$) ** $P < 0.01$ vs. RSDS/control-vehicle.

b. Time dependent changes in mechanical allodynia of contralateral hind paw in control diet mice.

(RSDS/control-vehicle = 7, RSDS/control-DHA = 8).

c. Time dependent changes in mechanical allodynia of ipsilateral hind paw in n-3 deficient diet mice.

A two-way analysis of variance followed by Bonferroni's post hoc test in ipsilateral (time \times drug: $F_{2, 22} = 11.68$, $P = 0.0003$, time: $F_{2, 22} = 34.05$, $P < 0.0001$, drug: $F_{1, 11} = 29.54$, $P = 0.0002$) ** $P < 0.01$ vs. RSDS/n-3 def-vehicle.

d. Time dependent changes in mechanical allodynia of contralateral hind paw in control diet mice.

A two-way analysis of variance followed by Bonferroni's post hoc test in contralateral (time \times drug: $F_{2, 22} = 1.174$, $P = 0.3279$, time: $F_{2, 22} = 0.2141$, $P = 0.8089$, drug: $F_{1, 11} = 50.86$, $P < 0.0001$) ** $P < 0.01$ vs. RSDS/n-3 def-vehicle.

(RSDS/n-3 def-vehicle = 7, RSDS/n-3 def-DHA = 6).

Data are presented as mean \pm S.E.M.

4-3-6. 脳内 GPR40/FFAR1 シグナルの阻害が RSDS 暴露後の社会性行動に及ぼす影響

RSDS 暴露後の社会性相互作用試験において vehicle 群および、GW1100 群の SI ratio はほぼ全てが 1.0 以下を示した。しかしながら vehicle 群と比較して、GW1100 群に変化は見られなかった (Fig. 25a)。Vehicle 群と比較して、GW1100 群の総移動距離は何ら変化も示さなかった (Fig. 25c)。Target における interaction 領域の滞在時間は、vehicle 群および GW1100 群のいずれも no target と比較して、有意に減少した (Fig. 25b, d)。しかしながら、target において vehicle 群および GW1100 群間の差は認められなかった。Vehicle 群と比較して、GW1100 群の corner 領域への滞在時間は何ら変化も示さなかった (Fig. 25b, e)。Non-SDS 群の社会性相互作用試験において、target における interaction 領域への滞在時間は、vehicle 群および GW1100 群間で何ら変化も示さなかった (Fig. 25f)。

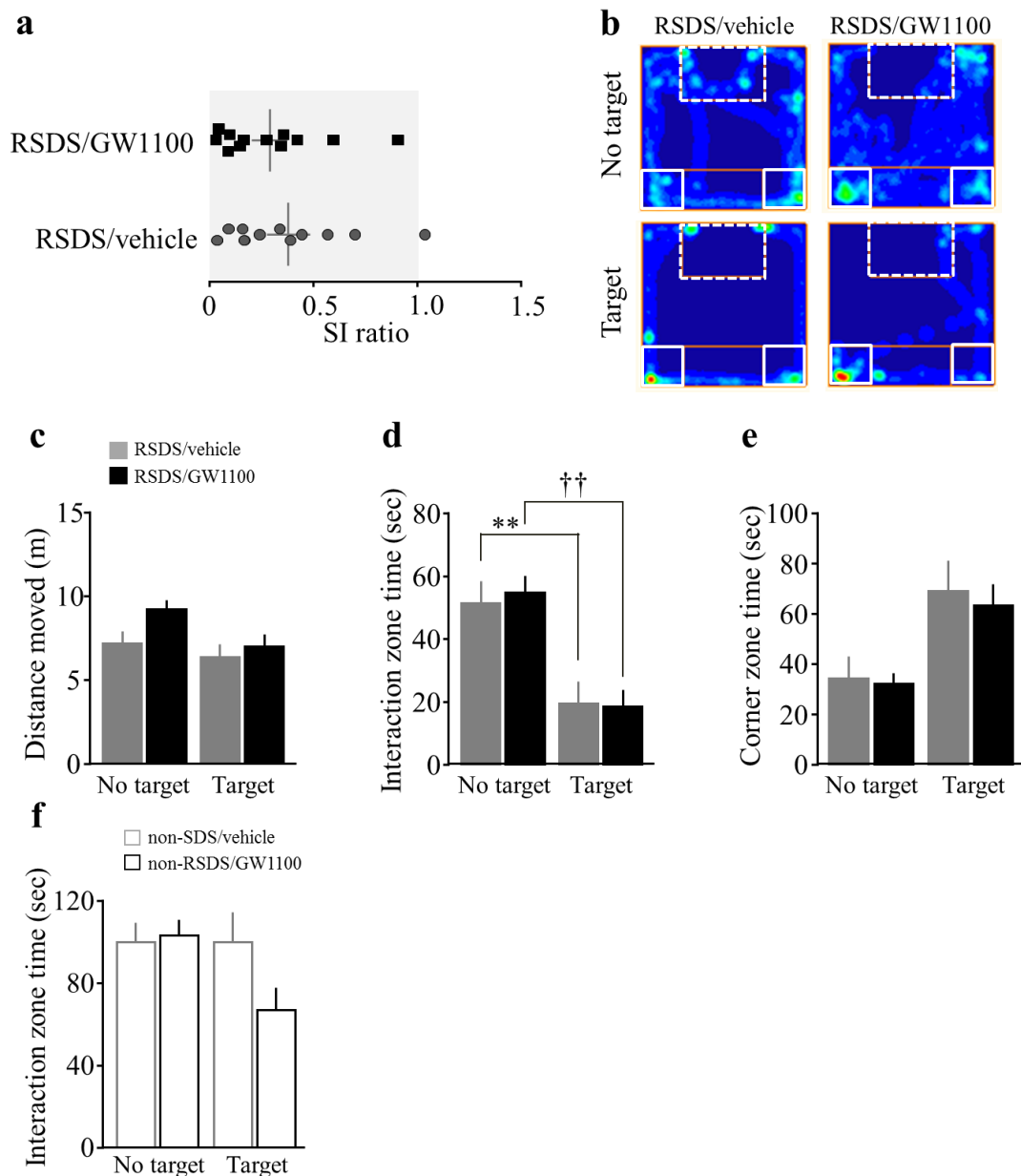


Fig. 25. Inhibition of GPR40/FFAR1 signaling in the brain did not affect to social behavior in RSDS mice.

- a. The profile of social interaction ratio at completed RSDS with vehicle or GW1100. Gray area represent susceptible (low social behavior).
- b. Represented moving plots both no target and target session in SI. White dots square represent interaction zone. White solid square represent corner zone.
- c. The total distance moved in SI.
- d. Time spent in interaction zone both no target and target session in SI. A two-way analysis of variance followed by Bonferroni's post hoc test in the difference of interaction (drug \times target: $F_{1,42} = 0.1416$, $P = 0.7086$, drug: $F_{1,42} = 30.35$, $P < 0.0001$, target: $F_{1,42} = 0.04299$, $P = 0.8368$) $^{**}P < 0.01$ vs. RSDS/vehicle (no target), $^{\dagger\dagger}P < 0.01$ vs. RSDS/GW1100 (no target)
- e. Time spent in two-corner zone both no target and target session in SI.
(RSDS/vehicle = 11, RSDS/GW1100 = 12).
- f. Ratio of time spent in interaction zone both no target and target session in non-SDS mice.
(non-SDS/vehicle = 12, non-SDS/GW1100 = 12).

SI, social interaction test

Data are presented as mean \pm S.E.M.

4-3-7. 脳内 GPR40/FFAR1 シグナルの阻害が RSDS 暴露後の不安様行動に及ぼす影響

RSDS 群のオープンフィールド試験において、GW1100 群の総移動距離、center 領域、および peripheral 領域への滞在時間は vehicle 群と同程度であった (Fig. 26a-d)。RSDS 群の高架式十字迷路試験において、GW1100 群の open arm への侵入回数および滞在時間は vehicle 群と同程度であった (Fig. 26e-g)。

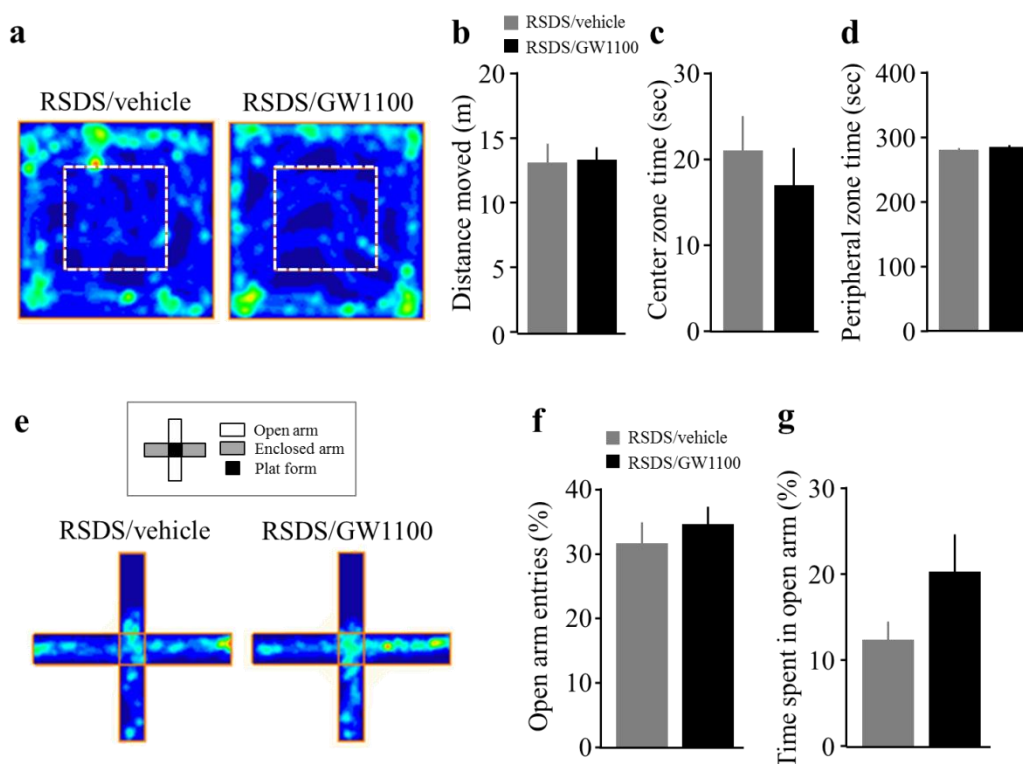


Fig. 26. Inhibition of GPR40/FFAR1 signaling in the brain did not affect to anxiety-like behavior in RSDS mice.

a. Represented moving plots of RSDS mice with vehicle or GW1100 infusion in OF. White dots square represent center zone.

b. The total distance moved during experiment in OF.

c. The time spent in center zone.

d. The time spent in peripheral zone.

e. Represented moving plots of RSDS mice with vehicle or GW1100 infusion in EPM.

f. The ratio of open arms entries.

g. The ratio of time spent in open arms.

(RSDS/vehicle = 11, RSDS/GW1100 = 12).

OF, open field test; EPM, elevated plus-maze test

Data are presented as mean \pm S.E.M.

4-3-8. RSDS 暴露に伴う脳内 GPR40/FFAR1 シグナルの阻害が術後痛処置によって生じる機械的痛覚過敏に及ぼす影響

Non-SDS/vehicle 群の von Frey 試験において、術後痛処置同側の機械的痛覚過敏は、術後 1 日目において sham 群と比較して有意に増加し、術後 7 日目で消失した。Non-SDS/GW1100 群の機械的痛覚過敏は、vehicle 群と同様に sham 群と比較して、術後 1 日目で有意に増加し、術後 7 日目で消失した (Fig. 27a)。GW1100 の投与は反対側において何ら変化も示さなかった (Fig. 27b)。

RSDS/vehicle 群、および RSDS/GW1100 群の機械的痛覚過敏は、術後痛惹起同側および反対側のいずれにおいても sham 群においては何ら変化を示さなかった (Fig. 13c, d)。一方、RSDS/vehicle 群において、機械的痛覚過敏は sham 群と比較して、術後 1 日目において有意に増加し、術後 28 日目まで持続した。RSDS/GW1100 群は、RSDS/vehicle 群と比較して、機械的痛覚過敏が術後 56 日目まで有意に延長した (Fig. 27c)。GW1100 の投与は RSDS 群の反対側において術後 14 および 42 日目の機械的痛覚過敏を有意に増加した (Fig. 27d)。

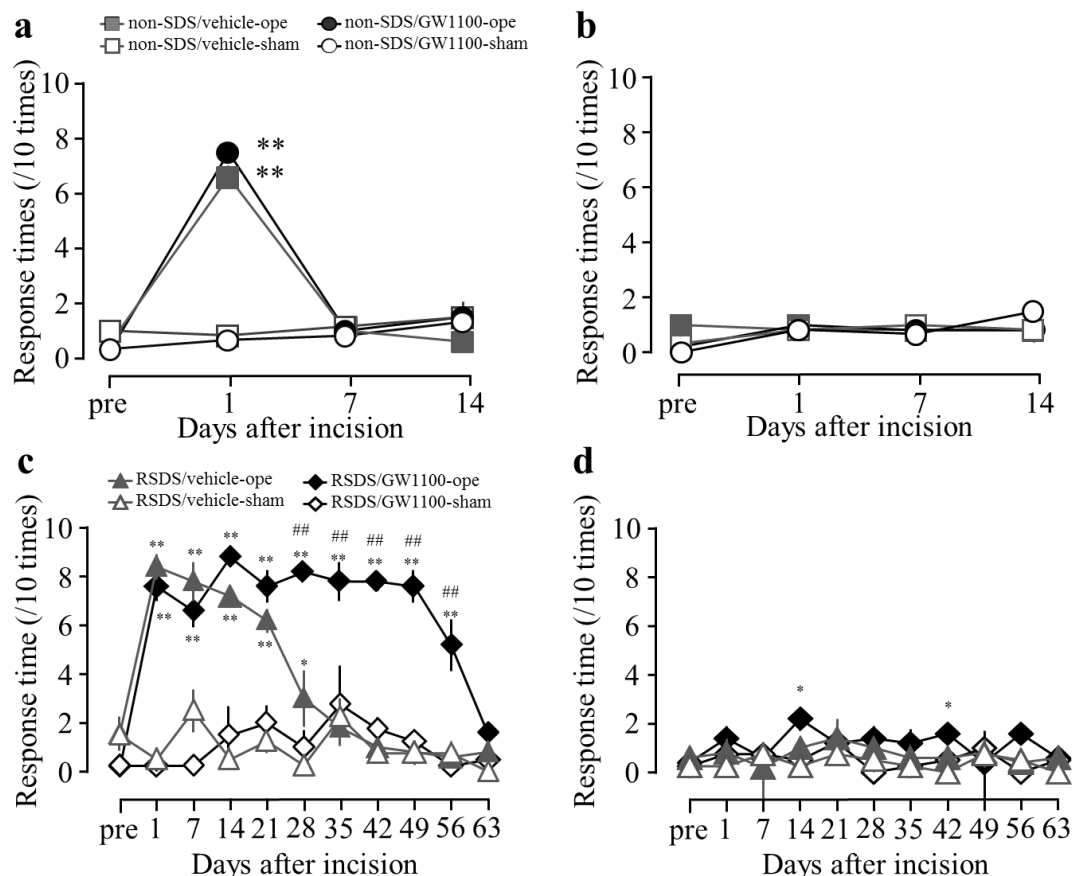


Fig. 27. Inhibition of GPR40/FFAR1 signaling in the brain induced mechanical allodynia prolongation in RSDS mice but not non-SDS mice.

a. Time dependent changes in response of ipsilateral hind paw to mechanical stimuli in non-SDS mice with vehicle or GW1100.

A two-way analysis of variance followed by Bonferroni 's post hoc test in ipsilateral (time \times treatment: $F_{9,57} = 33.50$, $P < 0.0001$, time: $F_{3,57} = 83.98$, $P < 0.0001$, treatment: $F_{3,19} = 17.44$, $P < 0.0001$) ** $P < 0.01$ vs. non-SDS/vehicle-sham.

b. Time dependent changes in response of contralateral hind paw to mechanical stimuli in non-SDS mice with vehicle or GW1100.

(non-SDS/vehicle-sham = 6, non-SDS/vehicle-o-pe = 6, non-SDS/GW1100-sham = 6, non-SDS/GW1100-o-pe = 5).

c. Time dependent changes in response of ipsilateral hind paw to mechanical stimuli in RSDS mice with vehicle or GW1100.

A two-way analysis of variance followed by Bonferroni 's post hoc test in ipsilateral (time \times treatment: $F_{21,105} = 10.05$, $P < 0.01$, time: $F_{7,105} = 13.93$, $P < 0.01$, treatment: $F_{3,15} = 299.5$, $P < 0.01$) ** $P < 0.01$ vs. RSDS/vehicle-sham.

d. Time dependent changes in response of contralateral hind paw to mechanical stimuli in non-SDS mice with vehicle or GW1100.

A two-way analysis of variance followed by Bonferroni 's post hoc test in contralateral (time \times treatment: $F_{30,140} = 0.8975$, $P = 0.6228$, time: $F_{10,140} = 1.145$, $P = 0.3333$, treatment: $F_{3,14} = 8.123$, $P = 0.0022$) * $P < 0.05$ vs. RSDS/vehicle-sham.

(RSDS/vehicle-sham = 4, RSDS/vehicle-o-pe = 5, RSDS/GW1100-sham = 4, RSDS/GW1100-o-pe = 5)

Data are presented as mean \pm S.E.M.

4-4. 考 察

第四章では、ストレス暴露後に生じる慢性疼痛形成メカニズムに対する DHA—GPR40/FFAR1 シグナル機構の関与について検討を行った。

第三章において、RSDS 暴露単独および RSDS 誘導性慢性疼痛時の脳全体に DHA 含有 PC の存在比低下が認められた。先行研究において、強制水泳ストレス暴露後には、抑うつ様行動の発現と共に、海馬において DHA が減少することを報告している³²⁾。ヒトにおいても、DHA や n-3 系脂肪酸の一種である EPA の減少は、うつ病をはじめとする中枢性疾患の発症および病態形成に関連している可能性が示唆されている^{94,114,115)}。さらに、第三章では、RSDS 暴露期間中に DHA を反復経口投与することによって、RSDS 誘導性慢性疼痛の形成が抑制されることを示した。よって、DHA の減少が RSDS 誘導性慢性疼痛の形成に重要な役割を果たす可能性が考えられる。生体内の DHA の大半は食餌中に含まれる DHA およびその前駆体である α -linolenic acid の量に依存している。そこで、Harauma らの報告³¹⁾をもとに、 α -linolenic acid を欠乏させた飼料を作製し食餌誘導性 n-3 系脂肪酸欠乏マウスを作製し、DHA の影響について検討した。実験に用いた 8 週齢時の n-3 系脂肪酸欠乏 (n-3 def) 食マウスでは、脳組織中に含まれる DHA が劇的に減少していた。この n-3 def 食マウスに対して、RSDS を暴露すると、control 食マウスと比較して、不安様行動は有意に増大した。Hibbeln は、本邦を含めた複数の国において、大うつ病の罹患率と魚の摂取量を検討している。その報告においては、本邦をはじめとする魚の摂取量が多い国では、大うつ病の罹患率が低いことが示されており、その原因としては 魚類に多く含まれている n-3 系脂肪酸の摂取量が相関する可能性を報告している³⁰⁾。Ahmad らは、n-3 系脂肪酸の摂取量の減少は、海馬における神経の樹状突起の分岐数に異常をもたらし、これに伴って社会性行動の低下や不安様行動の増加が誘導されている可能性を示している¹¹⁶⁾。事実、RSDS 暴露の際に DHA を反復経口投与した n-3 def 食マウスでは、不安様行動が抑制された。これらから、n-3 系脂肪酸は情動機能を正に制御する作用を有しており、この機能が破綻したことによってさらなる情動機能の悪化が誘導されたと考えられる。

次に、n-3 系脂肪酸の欠乏が疼痛行動に及ぼす影響を検討した。RSDS 暴露条件下、n-3 def 食マウスは、control 食マウスと比較して、術後痛処置を行う前の時点において、機械的痛覚閾値は有意に減少した。しかしながら、n-3 def 食マウスにおける機械的痛覚閾値の減少は、RSDS に暴露しない条件においても同様に認められた。また、この変化は、術後痛惹起同側のみならず、反対側においても観察された。これらのことから、機械的痛覚閾値の低下は直接 RSDS 暴露によって誘導されたのではなく、n-3 系脂肪酸の減少に依存して生じたものと考えられる。そこで、n-3 def 食を維持した条件にて、DHA を反復経口投与し、機械的痛覚閾値の低下が消失するか検討を行った。DHA の反復経口投与は、n-3 系脂肪酸欠乏によって生じた機械的痛覚閾値の低下を改善したのみならず、RSDS 暴露によって生じる術後痛の慢性化も抑制した。侵害受容性神経において、脂質関連因子である sterol regulatory element binding protein (SREBP) が神経機能維持に必要であることが報告されてい

る¹¹⁷⁾。また、坐骨神経の一部を結紮するモデルである PSNL モデルマウスでは、DHA および EPA を 10 日間にわたって投与すると、PSNL 処置によって生じる機械的刺激および熱的刺激に対する過敏性が減少することが報告されている¹⁰⁷⁾。また、この報告においては、DHA および EPA の投与群において、PSNL 処置で生じたミエリンの消失が改善したことから n-3 系脂肪酸は、神経保護的な作用を有することが示されている。本研究においては、神経の構造変化について、検討を行えていないが、これらの報告から、長期的に n-3 系脂肪酸が欠乏することで、痛みの伝達に関わる神経系の構造に変化がもたらされたことによって、機械的痛覚過敏の増加が生じた可能性が考えられる。RSDS 誘導性慢性疼痛の形成は DHA によって抑制された一方で、術後痛処置早期である 1 日目の機械的痛覚過敏は DHA および vehicle 群において同程度であった。先行研究において、DHA の単回経口投与は、熱性痛覚過敏および formalin 誘発性疼痛を用量依存のかつ速やかに抑制することが報告されている。また、DHA を側脳室内へ単回投与した場合においても同様に、痛みは抑制された。今回の検討において、DHA の反復投与は、不安様行動を軽減したこと、および術後惹起 1 日目の機械的痛覚過敏を抑制しなかったが、7 日目の機械的痛覚過敏を抑制したことから、ストレス暴露時に投与した DHA は痛みを直接的に抑制したのではなく、不安様行動を軽減したことによって痛みの慢性化を抑制したことが考えられる。即ち、ストレス暴露によって生じる DHA の減少が、情動機能異常の悪化に関与することによって痛みの慢性化が誘導されていることが示唆された。

以上の検討から、DHA が RSDS 誘導性慢性疼痛の形成に関与することが示された。次に、そのメカニズムについて検討するために、DHA の標的受容体である GPR40/FFAR1 に着目した。GPR40/FFAR1 欠損マウスにおいては、ストレスに暴露しない条件下、術後痛処置を施すことによって機械的痛覚過敏が 14 日にわたって持続するという知見を得ている¹⁰¹⁾。さらに、我々の先行研究^{32,43)}、および第一章の検討結果から、脳内に発現する GPR40/FFAR1 は情動の制御にも関与することが見出されている。これらのことから、RSDS 暴露と同時に脳内の GPR40/FFAR1 を阻害することによって、ストレスへの感受性の増加あるいは疼痛伝達経路が増強され、術後痛のさらなる慢性化が誘導された可能性が考えられる。そこで、RSDS 暴露期間にのみ、側脳室内へ GPR40/FFAR1 アンタゴニストである GW1100 を持続注入し、その後の情動および疼痛行動の解析を行った。

Non-SDS 条件において、脳内の GPR40/FFAR1 シグナルを阻害しても術後痛惹起後の機械的痛覚過敏にはなんら影響は示されなかったが、RSDS 暴露と同時に脳内の GPR40/FFAR1 を阻害することによって、機械的痛覚過敏は約 2 か月にわたって持続した。GPR40/FFAR1 は中脳一延髄の下行性疼痛抑制系の直接的な賦活化、ならびに視床下部弓状核からの β -endorphin 放出を介して痛みを制御する^{26,118)}。ストレスに暴露しなかったマウスにおいては、GPR40/FFAR1 を持続的に阻害しても痛みの慢性化は生じなかったことから、術後痛惹起の時点では GPR40/FFAR1 アンタゴニストの影響は消失していることが推察される。したがって、本研究において見出された GPR40/FFAR1 阻害による痛みの持続には、疼痛制

御に関与する神経系に発現する GPR40/FFAR1 の関与は低いと考えられる。

情動制御に関わる海馬や扁桃体、前頭前野は単に情動を制御するのではなく、痛みの刺激に伴う情動の制御を担うことが知られている。海馬では、SDS 暴露によって歯状回に発現する神経細胞の活性化が抑制されると社会性行動の低下および不安様行動の増大が生じる³⁶⁾。扁桃体は、中心核や基底外側核などに細分化されており、それぞれの役割が異なることが知られている¹¹⁹⁾。実際に、扁桃体中心核は内臓痛に、扁桃体基底外側核は体性痛に伴う嫌悪行動に関連することが報告されている¹²⁰⁾。また、Neugebauer らは、扁桃体中心核に発現する神経の 8 割が侵害刺激に応答して活性化することを示している¹²¹⁾。ヒトの fMRI を用いた検討においては、他者の痛みに対する表情を見るだけで、前頭前野に存在する前帯状回が活性化することも報告されている^{122,123)}。ストレス暴露によって生じる社会性行動の低下および不安様行動とこれらの報告から、痛みを制御する神経系ではなく、情動機能を制御する神経系の機能不全が、間接的に痛みの責任脳領域および神経系の破綻を介して痛みを慢性化させている可能性が考えられる。しかしながら、本研究では GPR40/FFAR1 シグナルを RSDS と同時に阻害した直後において vehicle 処置群と同様に社会性の低下と不安様行動の増大を示したが、有意な変化は認められなかった。この原因としては、両群ともに RSDS に暴露されていたため、著明な変化が得られなかった可能性が考えられ、恐怖条件付け試験や尾懸垂試験などその他の行動試験を用いてさらに詳細な評価が必要となる。また、本研究では GPR40/FFAR1 アンタゴニストは局所投与ではなく、側脳室を介して投与しているため、脳のどの領域の GPR40/FFAR1 が関与するかは特定できていない。ストレス暴露後には各脳領域において、神経活動に変化が生じることが報告されており^{104,124)}、RSDS 後の脳内においても情動行動異常に伴って神経活動が変化し、痛みの伝達にも影響を及ぼすことで痛みの慢性化を誘導している可能性がある。今後、ストレス暴露によって特異的に変化する脳領域が特定できれば、より部位特異的なシグナル変化の解明が進むと考えられる。

第四章では、RSDS 誘導性慢性疼痛形成過程には、一部にストレス暴露によって生じる脳内 DHA の減少が関与していることが明らかとなった。また、ストレス暴露時に DHA を反復して投与しておくことによって、情動機能の改善と共に痛みの慢性化は抑制できるとや、その作用点として、脳内 GPR40/FFAR1 が関与する可能性が示された。これまでに、多くの臨床報告において、DHA の摂取がうつ病や慢性疼痛を抑制することが報告されている。本研究によって、情動機能異常を合併している慢性疼痛においても同様に DHA の変化が病態制御において重要であることが示された。以上から、DHA—GPR40/FFAR1 シグナルは、情動機能異常を合併する場合の慢性疼痛を抑制できる新たな創薬標的となることを示した。

総 括

本研究では、情動機能制御に対する脂肪酸—GPR40/FFAR1 シグナル機構の関与について検討を行い、さらに、不安症状を含めたストレスへの長期的暴露によって生じる痛みの慢性化メカニズムの解明を試み、以下の結果を得た。

1. 長鎖脂肪酸受容体 GPR40/FFAR1 の機能不全は、雄性マウスにおいて、不安様行動および抑うつ様行動に異常をきたした。
2. 炎症性刺激に応答した反応性アストロサイトは、細胞内における長鎖脂肪酸の増加および細胞外への DHA 遊離能を有していた。この変化に伴って iPLA₂ および cPLA₂ の発現が増加した。
3. 非ストレス暴露条件では痛みは速やかに消失するが、反復ストレス暴露後では、社会性行動の低下および不安様行動の増加が生じ、痛みの慢性化が誘導された。
4. ストレス暴露および慢性疼痛下では脳内リン脂質の存在比が変化した。
5. 脳内における n-3 系脂肪酸、特に DHA の減少がストレス誘導性慢性疼痛の形成および増悪を誘導した。さらに、ストレス暴露において生じる脳内 GPR40/FFAR1 シグナル機構の阻害によっても、DHA の減少と同様に慢性疼痛の増悪が誘導された。

以上、本研究において、長期間のストレス暴露によって生じる痛みの慢性化機構には、脳内の脂質、特に DHA の減少を介した GPR40/FFAR1 シグナル機構の低下が関連していることが示された。また、ストレス暴露時や慢性疼痛下において認められた脳内の脂質環境変動には、反応性アストロサイトを介した脂肪酸放出機構が存在することが明らかとなった。

慢性疼痛は、その病態形成機序のほとんどが明らかとされていないのみならず、近年、不安や抑うつ、恐怖などの情動因子や、痛みによる就業制限や経済的負担の増加を含めた社会的因子などの痛み以外の要因が痛みを複雑化させて、慢性疼痛をさらに難治化させていると考えられている。一般的な疼痛治療では、非ステロイド性消炎鎮痛剤やアセトアミノフェンなどが用いられているが、慢性疼痛においては無効あるいは奏効しない場合が多い。また、フェンタニルやトラマドールなどのオピオイド鎮痛薬は、強力な鎮痛作用を有することから、非ステロイド性消炎鎮痛剤等では抑制できないがん性疼痛および非がん性

疼痛の両者に対して使用されている。しかしながら、オピオイド鎮痛薬の場合、鎮痛効果への耐性が形成されることがや薬物依存、便秘などの副作用発現などの観点から、一部の限られた患者においてのみ使用されるにとどまり、諸外国と比較して導入率が低いのが現状である。本研究では、既存の鎮痛薬とは作用点の異なる新規標的として、脂肪酸に着目し、脳内 GPR40/FFAR1 が情動機能異常の合併に伴って生じる痛みの慢性化を抑制できる可能性を見出した。GPR40/FFAR1 を含めた脂肪酸受容体は近年急速にその生理機能の解析が進められている。本研究によって不安障害やうつ病に伴う難治性の慢性疼痛に対する創薬標的として、脳内 GPR40/FFAR1 の可能性を示した。本成果をもとに、さらに病態特異的な細胞集団および分子メカニズムが解明されることで、慢性疼痛を治療するに限らず、痛みを慢性化させないための新たな治療法の開発につながることを期待される。

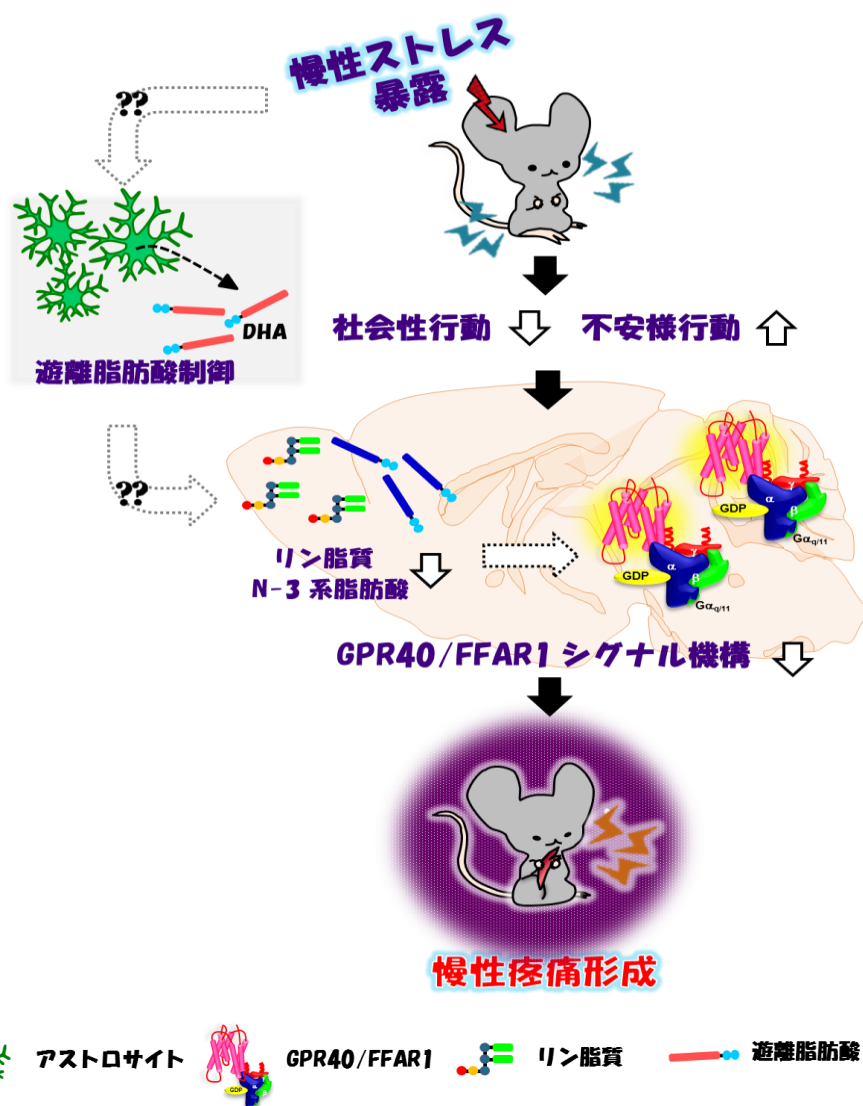


Fig. 24 Graphical summary; a possible mechanism of the chronic pain with psychiatry disorder.

謝 辞

本研究は、神戸学院大学大学院薬学研究科博士課程在学中に、同大学薬学部臨床薬学研究室 徳山 尚吾 教授の指導のもとに行ったものである。

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたって、ご指導、ご鞭撻を賜りました神戸学院大学薬学部臨床薬学研究室 徳山 尚吾 教授に心より感謝申し上げます。

本論文の作成にあたり、ご校閲ならびにご助言を賜りました神戸学院大学薬学部 岡本正志 教授、李 英培 教授に謹んで深謝致します。

本研究は、以下の諸先生方のご指導、ご助力のもと遂行いたしました。謹んで感謝申し上げます。

- ・ GPR40/FFAR1 欠損マウス作製および供与
京都大学大学院 薬学研究科 医薬創成情報科学専攻医薬創成情報科学講座
平澤 明 准教授
鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科 生体情報薬理学
宮田 篤郎 教授、栗原 崇 准教授
- ・ 遊離脂肪酸測定および解析
神戸学院大学 薬学部 毒性学研究室
糟谷 史代 教授、山下 琢矢 助教授
- ・ リン脂質イメージング解析
浜松医科大学 医学部 細胞分子解剖学講座
瀬籐 光利 教授、山崎 文義 特任助教授
浜松医科大学 光イメージング研究室
矢尾 育子 准教授
- ・ 初代培養アストロサイト作製
神戸薬科大学 薬理学研究室
小山 豊 教授
大阪大谷大学 薬学部 薬理学研究室
道永 昌太郎 助教授

また、本研究の一部は下記の助成によって遂行いたしました。

- ・ 公益社団法人 日本薬学会 日本薬学会長井記念薬学研究奨励金
- ・ 独立行政法人日本学術振興会
日本学術振興会特別研究員 DC2 (神戸学院大学大学院薬学研究科)
Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) KAKENHI Grant Number JP18J13473

本研究の遂行ならびに論文作成に際し、多大なるご指導、ご助言を賜りました、神戸学院大学薬学部臨床薬学研究室 中本 賀寿夫 講師に心から御礼申し上げます。

また、実験に協力して頂いた後輩達を始め、共に研究室生活を過ごし、共に苦楽を分かち合った本研究室の皆様および卒業生の皆様に心から感謝申し上げます。

末筆になりましたが、これまで大変な心配とご苦勞をおかけしたにも関わらず、温かく見守り、多大なるご支援を頂きました家族に心より感謝の意を表します。

引用文献

- 1) Treede RD. The International Association for the Study of Pain definition of pain: as valid in 2018 as in 1979, but in need of regularly updated footnotes. *Pain reports*, **3**, e643 (2018)
- 2) Task Force on Taxonomy of the International Association for the Study of Pain. Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. *Pain. Suppl.*, **3**, S1-226 (1986)
- 3) Treede RD, Rief W, Barke A, Aziz Q, Bennett MI, Benoliel R, Cohen M, Evers S, Finnerup NB, First MB, Giamberardino MA, Kaasa S, Kosek E, Lavand'homme P, Nicholas M, Perrot S, Scholz J, Schug S, Smith BH, Svensson P, Vlaeyen JWS, Wang SJ. A classification of chronic pain for ICD-11. *Pain*, **156**, 1003–1007 (2015)
- 4) Yabuki S, Ushida T, Takeshita K, Saura R, Ogawa S, Katsumata A, Hatanaka S. A Nationwide Survey of Chronic Pain Sufferer in Japan. *Clin. Orthop. Surg.*, **47**, 127-134 (2012)
- 5) Lynch ME, Watson CPN. The pharmacotherapy of chronic pain: a review. *Pain Res. Manag.*, **11**, 11–38 (2006)
- 6) Ogawa S, Iseki M, Kikuchi S. A Large-scale Survey on Chronic Pain and Neuropathic Pain in Japan. *Clin. Orthop. Surg.*, **47**, 565-574 (2012)
- 7) McGreevy K, Bottros MM, Raja SN. Preventing Chronic Pain following Acute Pain: Risk Factors, Preventive Strategies, and their Efficacy. *Eur. J. Pain Suppl.*, **5**, 365–372 (2011)
- 8) Pagé G, Campbell F, Isaac L, Stinson J, Katz J. Parental risk factors for the development of pediatric acute and chronic postsurgical pain: a longitudinal study. *J. Pain Res.*, **6**, 727 (2013)
- 9) Shibata M, Ninomiya T, Jensen MP, Anno K, Yonemoto K, Makino S, Iwaki R, Yamashiro K, Yoshida T, Imada Y, Kubo C, Kiyohara Y, Sudo N, Hosoi M. Alexithymia is associated with greater risk of chronic pain and negative affect and with lower life satisfaction in a general population: the Hisayama Study. *PLoS One*, **9**, e90984 (2014)
- 10) Vadivelu N, Kai AM, Kodumudi G, Babayan K, Fontes M, Burg MM. Pain and Psychology-A Reciprocal Relationship. *Ochsner J.*, **17**, 173–180 (2017)
- 11) Han C and Pae CU. Pain and depression: a neurobiological perspective of their relationship. *Psychiatry Investig.*, **12**, 1–8 (2015)
- 12) Baliki MN, Schnitzer TJ, Bauer WR, Apkarian AV. Brain morphological signatures for chronic pain. *PLoS One*, **6**, e26010 (2011)
- 13) Ji RR, Xu ZZ, Gao YJ. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **13**, 533–548 (2014)
- 14) Haag M. Essential Fatty Acids and the Brain. *Can. J. Psychiatry*, **48**, 195–203 (2003)
- 15) Laugero K, Adkins Y, Mackey B, and Kelley D. Emotion-Based Cognition in Mice Is

- Differentially Influenced by Dose and Chemical Form of Dietary Docosahexaenoic Acid.
Nutrients, **9**, 993 (2017)
- 16) Hibbeln JR. Seafood consumption, the DHA content of mothers' milk and prevalence rates of postpartum depression: A cross-national, ecological analysis. *J. Affect. Disord.*, **69**, 15–29 (2002)
 - 17) Ko GD, Nowacki NB, Arseneau L, Eitel M, Hum A. Omega-3 fatty acids for neuropathic pain: case series. *Clin. J. Pain*, **26**, 168–172 (2010)
 - 18) Buydens-Branchey L, Branchey M, Hibbeln JR. Associations between increases in plasma n-3 polyunsaturated fatty acids following supplementation and decreases in anger and anxiety in substance abusers. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **32**, 568–575 (2008)
 - 19) Weylandt KH, Chiu CY, Gomolka B, Waechter SF, Wiedenmann B. Omega-3 fatty acids and their lipid mediators: Towards an understanding of resolvins and protectin formation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, **97**, 73–82 (2012)
 - 20) Briscoe CP, Tadayyon M, Andrews JL, Benson WG, Chambers JK, Eilert MM, Ellis C, Elshourbagy NA, Goetz AS, Minnick DT, Murdock PR, Sauls HR, Shabon U, Spinage LD, Strum JC, Szekeres PG, Tan KB, Way JM, Ignar DM, Wilson S, Muir AI. The Orphan G Protein-coupled Receptor GPR40 Is Activated by Medium and Long Chain Fatty Acids. *J. Biol. Chem.*, **278**, 11303–11311 (2003)
 - 21) Nakamoto K, Nishinaka T, Matsumoto K, Kasuya F, Mankura M, Koyama Y, Tokuyama S. Involvement of the long-chain fatty acid receptor GPR40 as a novel pain regulatory system. *Brain Res.*, **1432**, 74–83 (2012)
 - 22) Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, Kobayashi M, Fujii R, Fukusumi S, Ogi K, Hosoya M, Tanaka Y, Uejima H, Tanaka H, Maruyama M, Satoh R, Okubo S, Kizawa H, Komatsu H, Matsumura F, Noguchi Y, Shinohara T, Hinuma S, Fujisawa Y, Fujino M. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic β cells through GPR40. *Nature*, **422**, 173–176 (2003)
 - 23) Yamada H, Yoshida M, Ito K, Dezaki K, Yada T, Ishikawa SE, Kakei M. Potentiation of Glucose-stimulated Insulin Secretion by the GPR40–PLC–TRPC Pathway in Pancreatic β -Cells. *Sci. Rep.*, **6**, 25912 (2016)
 - 24) Otieno MA, Snoeys J, Lam W, Ghosh A, Player MR, Pocai A, Salter R, Simic D, Skaggs H, Singh B, Lim HK. Fagiglifam (TAK-875): Mechanistic Investigation and Retrospective Identification of Hazards for Drug Induced Liver Injury. *Toxicol. Sci.*, **163**, 374–384 (2017)
 - 25) Nakamoto K, Nishinaka T, Sato N, Mankura M, Koyama Y, Kasuya F, Tokuyama S. Hypothalamic GPR40 signaling activated by free long chain fatty acids suppresses CFA-induced inflammatory chronic pain. *PLoS One*, **8**, 2–12 (2013)
 - 26) Nakamoto K, Nishinaka T, Sato N, Aizawa F, Yamashita T, Mankura M, Koyama Y, Kasuya F, Tokuyama S. The activation of supraspinal GPR40/FFA1 receptor signalling regulates the descending pain control system. *Br. J. Pharmacol.*, **172**, 1250–1262 (2015)

- 27) Sastry PS. Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. *Prog. Lipid Res.*, **24**, 69–176 (1985)
- 28) Matsumoto J, Sugiura Y, Yuki D, Hayasaka T, Goto-Inoue N, Zaima N, Kunii Y, Wada A, Yang Q, Nishiura K, Akatsu H, Hori A, Hashizume Y, Yamamoto T, Ikemoto K, Setou M, Niwa S. Abnormal phospholipids distribution in the prefrontal cortex from a patient with schizophrenia revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, **400**, 1933–1943 (2011)
- 29) Adibhatla RM and Hatcher JF. Altered lipid metabolism in brain injury and disorders. *Subcell. Biochem.*, **49**, 241–268 (2008)
- 30) Hibbeln JR. Fish consumption and major depression. *Lancet*, **351**, 1213 (1998)
- 31) Harauma A and Moriguchi T. Dietary n-3 Fatty Acid Deficiency in Mice Enhances Anxiety Induced by Chronic Mild Stress. *Lipids*, **46**, 409–416 (2011)
- 32) Nishinaka T, Yamashita T, Nakamoto K, Kasuya F, Tokuyama S, *J. Pharmacol. Sci.*, **125**, 112–115 (2014)
- 33) Zamarbide M, Etayo-Labiano I, Ricobaraza A, Martínez-Pinilla E, Aymerich MS, Luis Lanciego J, Pérez-Mediavilla A, Franco R. GPR40 activation leads to CREB and ERK phosphorylation in primary cultures of neurons from the mouse CNS and in human neuroblastoma cells. *Hippocampus*, **24**, 733–739 (2014)
- 34) Salomon RM and Cowan RL. Oscillatory serotonin function in depression. *Synapse*, **67**, 801–820 (2013)
- 35) Delgado PL. Depression: the case for a monoamine deficiency. *J. Clin. Psychiatry*, **61**, 7–11 (2000)
- 36) Anacker C, Luna VM, Stevens GS, Millette A, Shores R, Jimenez JC, Chen B, Hen R. Hippocampal neurogenesis confers stress resilience by inhibiting the ventral dentate gyrus. *Nature*, **559**, 98–102 (2018)
- 37) Berton O, McClung CA, Dileone RJ, Krishnan V, Renthal W, Russo SJ, Graham D, Tsankova N M, Bolanos CA, Rios M, Monteggia LM, Self DW, Nestler EJ. Essential Role of BDNF in the Mesolimbic Dopamine Pathway in Social Defeat Stress. *Science*, **311**, 864–868 (2006)
- 38) Moon ML, Joesting JJ, Lawson MA, Chiu GS, Blevins NA, Kwakwa KA, Freund GG. The saturated fatty acid, palmitic acid, induces anxiety-like behavior in mice. *Metabolism*, **63**, 1131–1140 (2014)
- 39) Contreras CM, Rodríguez-Landa JF, García-Ríos RI, Cueto-Escobedo J, Guillen-Ruiz G, Bernal-Morales B. Myristic acid produces anxiolytic-like effects in Wistar rats in the elevated plus maze. *Biomed. Res. Int.*, **2014**, 492141 (2014)
- 40) Ueno K, Togashi H, Mori K, Matsumoto M, Ohashi S, Hoshino A, Fujita T, Saito H, Minami M, Yoshioka M. Behavioural and pharmacological relevance of stroke-prone spontaneously

- hypertensive rats as an animal model of a developmental disorder. *Behav. Pharmacol.*, **13**, 1–13 (2002)
- 41) Altemus M, Sarvaiya N, and Neill Epperson C. Sex differences in anxiety and depression clinical perspectives. *Front. Neuroendocrinol.*, **35**, 320–30 (2014)
 - 42) Van Lieshout RJ and Boylan K. Increased Depressive Symptoms in Female but Not Male Adolescents Born at Low Birth Weight in the Offspring of a National Cohort. *Can. J. Psychiatry*, **55**, 422–430 (2010)
 - 43) Aizawa F, Ogaki Y, Kyoya N, Nishinaka T, Nakamoto K, Kurihara T, Hirasawa A, Miyata A, Tokuyama S. The Deletion of GPR40/FFAR1 Signaling Damages Maternal Care and Emotional Function in Female Mice. *Biol. Pharm. Bull.*, **40**, 1255–1259 (2017)
 - 44) Shively CA, Musselman DL, Willard SL. Stress, depression, and coronary artery disease: modeling comorbidity in female primates. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **33**, 133–144 (2009)
 - 45) Russo SJ, Murrough JW, Han MH, Charney DS, Nestler EJ. Neurobiology of resilience. *Nat. Neurosci.*, **15**, 1475–1484 (2012)
 - 46) Anacker C and Hen R. Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility — linking memory and mood. *Nat. Rev. Neurosci.*, **18**, 335–346 (2017)
 - 47) Sheline YI, Wang PW, Gado MH, Csernansky JG, Vannier MW. Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 3908–3913 (1996)
 - 48) Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J. Neurosci.*, **20**, 9104–9110 (2000)
 - 49) Boldrini M, Underwood MD, Hen R, Rosoklija GB, Dwork AJ, John Mann J, Arango V. Antidepressants increase neural progenitor cells in the human hippocampus. *Neuropsychopharmacology*, **34**, 2376–2389 (2009)
 - 50) Lesch KP and Waider J. Serotonin in the modulation of neural plasticity and networks: implications for neurodevelopmental disorders. *Neuron*, **76**, 175–191 (2012)
 - 51) Nestler EJ. Role of the Brain's Reward Circuitry in Depression: Transcriptional Mechanisms. *Int. Rev. Neurobiol.*, **124**, 151–170 (2015)
 - 52) Mathieu G, Géraldine M, Denis S, Stéphanie D, Langelier B, Bénédicte L, Denis I, Isabelle D, Lavialle M, Monique L, Vancassel S, Sylvie V. DHA enhances the noradrenaline release by SH-SY5Y cells. *Neurochem. Int.*, **56**, 94–100 (2010)
 - 53) Ramsden CE, Faurot KR, Zamora D, Palsos OS, MacIntosh BA, Gaylord S, Taha AY, Rapoport SI, Hibbeln JR, Davis JM, Mann JD. Targeted alterations in dietary n-3 and n-6 fatty acids improve life functioning and reduce psychological distress among patients with chronic headache. *Pain*, **156**, 587–596 (2015)
 - 54) Barres BA. The Mystery and Magic of Glia: A Perspective on Their Roles in Health and Disease. *Neuron*, **60**, 430–440 (2008)

- 55) Sofroniew MV and Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta. Neuropathol.*, **119**, 7–35 (2010)
- 56) Shinozaki Y, Shibata K, Yoshida K, Shigetomi E, Gachet C, Ikenaka K, Tanaka KF, Koizumi S. Transformation of Astrocytes to a Neuroprotective Phenotype by Microglia via P2Y1 Receptor Downregulation. *Cell Rep.*, **19**, 1151–1164 (2017)
- 57) Mason S. Lactate Shuttles in Neuroenergetics-Homeostasis, Allostasis and Beyond. *Front. Neurosci.*, **11**, 43 (2017)
- 58) Strokin M, Sergeeva M, Reiser G. Docosaehaenoic acid and arachidonic acid release in rat brain astrocytes is mediated by two separate isoforms of phospholipase A₂ and is differently regulated by cyclic AMP and Ca²⁺. *Br. J. Pharmacol.*, **139**, 1014–1022 (2003)
- 59) Trang T, Beggs S, Salter MW. ATP receptors gate microglia signaling in neuropathic pain. *Exp. Neurol.*, **234**, 354–361 (2012)
- 60) Koyama Y, Maebara Y, Hayashi M, Nagae R, Tokuyama S, Michinaga S. Endothelins reciprocally regulate VEGF-A and angiopoietin-1 production in cultured rat astrocytes: Implications on astrocytic proliferation. *Glia*, **60**, 1954–1963 (2012)
- 61) Gao YJ and Ji RR. Targeting astrocyte signaling for chronic pain. *Neurotherapeutics*, **7**, 482–493 (2010)
- 62) Dulka BN, Bress KS, Grizzell JA, Cooper MA. Social Dominance Modulates Stress-induced Neural Activity in Medial Prefrontal Cortex Projections to the Basolateral Amygdala. *Neuroscience*, **388**, 274–283 (2018)
- 63) Matsuda S, Peng H, Yoshimura H, Wen TC, Fukuda T, Sakanaka M. Persistent c-fos expression in the brains of mice with chronic social stress. *Neurosci. Res.*, **26**, 157–170 (1996).
- 64) Brulet R, Matsuda T, Zhang L, Miranda C, Giacca M, Kaspar BK, Nakashima K, Hsieh J. NeuroD1 Instructs Neuronal Conversion in Non-Reactive Astrocytes. *Stem Cell Reports*, **8**, 1506–1515 (2017)
- 65) Ben-Zvi A, Lacoste B, Kur E, Andreone BJ, Mayshar Y, Yan H, Gu C. Mfsd2a is critical for the formation and function of the blood–brain barrier. *Nature*, **509**, 507–511 (2014)
- 66) Gallo V and Deneen B. Glial development: the crossroads of regeneration and repair in the CNS. *Neuron*, **83**, 283–308 (2014)
- 67) Trang T, Beggs S, and Salter MW. Brain-derived neurotrophic factor from microglia: a molecular substrate for neuropathic pain. *Neuron Glia Biol.*, **7**, 99–108 (2011)
- 68) Hara M, Kobayakawa K, Ohkawa Y, Kumamaru H, Yokota K, Saito T, Kijima K, Yoshizaki S, Harimaya K, Nakashima Y, Okada S. Interaction of reactive astrocytes with type I collagen induces astrocytic scar formation through the integrin-N-cadherin pathway after spinal cord injury. *Nat. Med.*, **23**, 818–828 (2017)
- 69) Sezgin E, Levental I, Mayor S, Eggeling C. The mystery of membrane organization: composition,

- regulation and roles of lipid rafts. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **18**, 361–374 (2017)
- 70) LaBrant E, Barnes AC, Roston RL. Lipid transport required to make lipids of photosynthetic membranes. *Photosynth Res.*, **138**, 345–360 (2018)
 - 71) Hashidate-Yoshida T, Harayama T, Hishikawa D, Morimoto R, Hamano F, Tokuoka SM, Eto M, Tamura-Nakano M, Yanobu-Takanashi R, Mukumoto Y, Kiyonari H, Okamura T, Kita Y, Shindou H, Shimizu T. Fatty acid remodeling by LPCAT3 enriches arachidonate in phospholipid membranes and regulates triglyceride transport. *Elife*, **4**, eLife.06328 (2015)
 - 72) Ebrahimi M, Yamamoto Y, Sharifi K, Kida H, Kagawa Y, Yasumoto Y, Islam A, Miyazaki H, Shimamoto C, Maekawa M, Mitsushima D, Yoshikawa T, Owada Y. Astrocyte-expressed FABP7 regulates dendritic morphology and excitatory synaptic function of cortical neurons. *Glia*, **64**, 48–62 (2016)
 - 73) Betsholtz C. Lipid transport and human brain development. *Nat. Genet.*, **47**, 699–701 (2015)
 - 74) Wong LH, Čopič A, Levine TP. Advances on the Transfer of Lipids by Lipid Transfer Proteins. *Trends Biochem. Sci.*, **42**, 516–530 (2017)
 - 75) Bravo E, Napolitano M, Benedetti Valentini S, Quattrucci S. Neutrophil unsaturated fatty acid release by GM-CSF is impaired in cystic fibrosis. *Lipids Health Dis.*, **9**, 129 (2010)
 - 76) Yagami T. Cerebral arachidonate cascade in dementia: Alzheimer's disease and vascular dementia. *Curr. Neuropharmacol.*, **4**, 87–100 (2006)
 - 77) Sun GY, Xu J, Jensen MD, Yu S, Wood WG, González FA, Simonyi A, Sun AY, Weisman GA. Phospholipase A₂ in astrocytes: responses to oxidative stress, inflammation, and G protein-coupled receptor agonists. *Mol. Neurobiol.*, **31**, 27–41 (2005)
 - 78) Sun GY, Chuang DY, Zong Y, Jiang J, Lee JC, Gu Z, Simonyi A. Role of Cytosolic Phospholipase A₂ in Oxidative and Inflammatory Signaling Pathways in Different Cell Types in the Central Nervous System. *Mol. Neurobiol.*, **50**, 6–14 (2014)
 - 79) Yabuuchi H and O'Brien JS. Positional distribution of fatty acids in glycerophosphatides of bovine gray matter. *J. Lipid Res.*, **9**, 65–67 (1968)
 - 80) Smani T, Zakharov SI, Leno E, Csutora P, Trepakova ES, Bolotina VM. Ca²⁺-independent phospholipase A₂ is a novel determinant of store-operated Ca²⁺ entry. *J. Biol. Chem.*, **278**, 11909–11915 (2003)
 - 81) Dragano NRV, Solon C, Ramalho AF, de Moura RF, Razolli DS, Christiansen E, Azevedo C, Ulven T, Velloso LA. Polyunsaturated fatty acid receptors, GPR40 and GPR120, are expressed in the hypothalamus and control energy homeostasis and inflammation. *J. Neuroinflammation*, **14**, 91 (2017)
 - 82) Choi SR, Roh DH, Yoon SY, Kwon SG, Choi HS, Han HJ, Beitz AJ, Lee JH. Astrocyte sigma-1 receptors modulate connexin 43 expression leading to the induction of below-level mechanical allodynia in spinal cord injured mice. *Neuropharmacology*, **111**, 34–46 (2016)

- 83) Abeysinghe H, Phillips E, Chin-Cheng H, Beart P, Roulston C. Modulating Astrocyte Transition after Stroke to Promote Brain Rescue and Functional Recovery: Emerging Targets Include Rho Kinase. *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 288 (2016)
- 84) Acosta C, Anderson HD, Anderson CM. Astrocyte dysfunction in Alzheimer disease. *J. Neurosci. Res.*, **95**, 2430–2447 (2017)
- 85) Li C, Yang Y, Liu S, Fang H, Zhang Y, Furmanski O, Skinner J, Xing Y, Johns RA, Haganir RL, Tao F. Stress induces pain transition by potentiation of AMPA receptor phosphorylation. *J. Neurosci.*, **34**, 13737–13746 (2014)
- 86) Von Korff M, and Simon G. The relationship between pain and depression. *Br. J. Psychiatry. Suppl.*, 101–108 (1996)
- 87) Teh CF, Morone NE, Karp JF, Belnap BH, Zhu F, Weiner DK, Rollman BL. Pain interference impacts response to treatment for anxiety disorders. *Depress. Anxiety*, **26**, 222–228 (2009)
- 88) Galloway SK, Baker M, Giglio P, Chin S, Madan A, Malcolm R, Serber ER, Wedin S, Balliet W, Borckardt J. Depression and Anxiety Symptoms Relate to Distinct Components of Pain Experience among Patients with Breast Cancer. *Pain Res. Treat.*, **2012**, 851276 (2012)
- 89) Baxter AA, Hulett MD, Poon IK. Depression and Anxiety Symptoms Relate to Distinct Components of Pain Experience among Patients with Breast Cancer. *Cell Death Differ.*, **22**, 1893–1905 (2015)
- 90) Salzer JL. Schwann Cell Myelination. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **7**, a020529 (2015)
- 91) Vasquez AM, Mouchlis VD, Dennis EA. Review of four major distinct types of human phospholipase A₂. *Adv. Biol. Regul.*, **67**, 212–218 (2018)
- 92) Matsumoto J, Nakanishi H, Kunii Y, Sugiura Y, Yuki D, Wada A, Hino M, Niwa SI, Kondo T, Waki M, Hayasaka T, Masaki N, Akatsu H, Hashizume Y, Yamamoto S, Sato S, Sasaki T, Setou M, Yabe H. Abnormal phospholipids distribution in the prefrontal cortex from a patient with schizophrenia revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry. *Sci. Rep.*, **7**, 45050 (2017)
- 93) Horrocks LA, and Farooqui AA. Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids*, **70**, 361–372 (2004)
- 94) Colangelo LA, He K, Whooley MA, Daviglus ML, Liu K. Higher dietary intake of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids is inversely associated with depressive symptoms in women. *Nutrition*, **25**, 1011–1019 (2009)
- 95) Ramsden CE, Zamora D, Makriniannis A, Wood JT, Mann JD, Faurot KR, MacIntosh BA, Majchrzak-Hong SF, Gross JR, Courville AB, Davis JM, Hibbeln JR. Targeted alterations in dietary n-3 and n-6 fatty acids improve life functioning and reduce psychological distress among patients with chronic headache: a secondary analysis of a randomized trial. *J. Pain*, **16**, 707–716

- (2015)
- 96) Krishnan V, Han MH, Graham DL, Berton O, Renthal W, Russo SJ, LaPlant Q, Graham A, Lutter M, Lagace DC, Ghose S, Reister R, Tannous P, Green TA, Neve RL, Chakravarty S, Kumar A, Eisch AJ, Self DW, Lee FS, Tamminga CA, Cooper DC, Gershenfeld HK, Nestler EJ. Molecular Adaptations Underlying Susceptibility and Resistance to Social Defeat in Brain Reward Regions. *Cell*, **131**, 391–404 (2007)
 - 97) Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF. Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain*, **64**, 493–501 (1996)
 - 98) Pogatzki EM and Raja SN. A mouse model of incisional pain. *Anesthesiology*, **99**, 1023–1027 (2003)
 - 99) Mallei A, Ieraci A, Popoli M. Chronic Social Defeat Stress Differentially Regulates the Expression of BDNF transcripts and Epigenetic Modifying Enzymes in Susceptible and Resilient Mice. *World J. Biol. Psychiatry*, 1–32 (2018)
 - 100) Gracia-Rubio I, Moscoso-Castro M, Pozo OJ, Marcos J, Nadal R, Valverde O. Maternal separation induces neuroinflammation and long-lasting emotional alterations in mice. *Prog. NeuroPsychopharmacology Biol. Psychiatry*, **65**, 104–117 (2016)
 - 101) Nakamoto K, Aizawa F, Miyagi K, Yamashita T, Mankura M, Koyama Y, Kasuya F, Hirasawa A, Kurihara T, Miyata A, Tokuyama S. Dysfunctional GPR40/FFAR1 signaling exacerbates pain behavior in mice. *PLoS One*, **12**, e0180610 (2017)
 - 102) Li MJ, Liu LY, Chen L, Cai J, Wan Y, Xing GG. Chronic stress exacerbates neuropathic pain via the integration of stress-affect related information with nociceptive information in the central nucleus of the amygdala. *Pain*, **158**, 717-739 (2016)
 - 103) Kendall-Tackett K. A new paradigm for depression in new mothers: the central role of inflammation and how breastfeeding and anti-inflammatory treatments protect maternal mental health. *Int. Breastfeed. J.*, **2**, 6 (2007)
 - 104) Hultman R, Ulrich K, Sachs BD, Blount C, Carlson DE, Ndubuizu N, Bagot RC, Parise EM, Vu MAT, Gallagher NM, Wang J, Silva AJ, Deisseroth K, Mague SD, Caron MG, Nestler EJ, Carin L, Dziras K. Brain-wide Electrical Spatiotemporal Dynamics Encode Depression Vulnerability. *Cell*, **173**, 166–180 (2018)
 - 105) Bagot RC, Parise EM, Peña CJ, Zhang HX, Maze I, Chaudhury D, Persaud B, Cachope R, Bolaños-Guzmán CA, Cheer JF, Deisseroth K, Han MH, Nestler EJ. Ventral hippocampal afferents to the nucleus accumbens regulate susceptibility to depression. *Nat. Commun.*, **6**, 7062 (2015)
 - 106) Müller CP, Reichel M, Mühle C, Rhein C, Gulbins E, Kornhuber J. Brain membrane lipids in major depression and anxiety disorders. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1851**, 1052–1065 (2015)
 - 107) Silva RV, Oliveira JT, Santos BLR, Dias FC, Martinez AMB, Lima CKF, Miranda ALP.

- Long-Chain Omega-3 Fatty Acids Supplementation Accelerates Nerve Regeneration and Prevents Neuropathic Pain Behavior in Mice. *Front. Pharmacol.*, **8**, 723 (2017)
- 108) Gornati R, Berra B, Montorfano G, Martini C, Ciana G, Ferrari P, Romano M, Bembi B. Glycolipid analysis of different tissues and cerebrospinal fluid in type II Gaucher disease. *J. Inherit. Metab. Dis.*, **25**, 47–55 (2002)
- 109) Jump DB, Depner CM, Tripathy S. Omega-3 fatty acid supplementation and cardiovascular disease. *J. Lipid Res.*, **53**, 2525–2545 (2012)
- 110) Barbalho SM, Goulart RA, Quesada K, Bechara MD, de Carvalho Ade C. Inflammatory bowel disease: can omega-3 fatty acids really help? *Ann. Gastroenterol.*, **29**, 37–43 (2016)
- 111) Pawełczyk T, Piątkowska-Janko E, Bogorodzki P, Gębski P, Grancow-Grabka M, Trafalska E, Żurner N, Pawełczyk A. Omega-3 fatty acid supplementation may prevent loss of gray matter thickness in the left parieto-occipital cortex in first episode schizophrenia: A secondary outcome analysis of the OFFER randomized controlled study. *Schizophr. Res.*, **195**, 168–175 (2018)
- 112) Calder PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1851**, 469–484 (2015)
- 113) Nakamoto K, Nishinaka T, Mankura M, Fujita-Hamabe W, Tokuyama S. Antinociceptive effects of docosahexaenoic acid against various pain stimuli in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 1070–1072 (2010)
- 114) Das UN. Essential fatty acids and their metabolites could function as endogenous HMG-CoA reductase and ACE enzyme inhibitors, anti-arrhythmic, anti-hypertensive, anti-atherosclerotic, anti-inflammatory, cytoprotective, and cardioprotective molecules. *Lipids Health Dis.*, **7**, 37 (2008)
- 115) Abdulrazaq M, Innes JK, Calder PC. Effect of ω -3 polyunsaturated fatty acids on arthritic pain: A systematic review. *Nutrition*, **39–40**, 57–66 (2017)
- 116) Wani AL, Bhat SA, Ara A. Omega-3 fatty acids and the treatment of depression: a review of scientific evidence. *Integr. Med. Res.*, **4**, 132–141 (2015)
- 117) Ziegler AB, Thiele C, Tenedini F, Richard M, Leyendecker P, Hoermann A, Soba P, Tavosanis G. Cell-Autonomous Control of Neuronal Dendrite Expansion via the Fatty Acid Synthesis Regulator SREBP. *Cell Rep.*, **21**, 3346–3353 (2017)
- 118) Nakamoto K, Nishinaka T, Ambo A, Mankura M, Kasuya F, Tokuyama S. Possible involvement of β -endorphin in docosahexaenoic acid-induced antinociception. *Eur. J. Pharmacol.*, **666**, 100–104 (2011)
- 119) Badrinarayan A, Prater KE, Orsini CA. The role of the central amygdala in selecting circuits and responses. *J. Neurosci.*, **32**, 8431–8433 (2012)
- 120) Tanimoto S, Nakagawa T, Yamauchi Y, Minami M, Satoh M. Differential contributions of the basolateral and central nuclei of the amygdala in the negative affective component of chemical

- somatic and visceral pains in rats. *Eur. J. Neurosci.*, **18**, 2343–2350 (2003)
- 121) Neugebauer V, Li W, Bird GC, Han JS. The Amygdala and Persistent Pain. *Neurosci.*, **10**, 221–234 (2004)
- 122) Jackson PL, Meltzoff AN, Decety J. How do we perceive the pain of others? A window into the neural processes involved in empathy. *Neuroimage*, **24**, 771–779 (2005)
- 123) Decety J, Michalska KJ, Akitsuki Y. Who caused the pain? An fMRI investigation of empathy and intentionality in children. *Neuropsychologia*, **46**, 2607–2614 (2008)
- 124) Kumar S, Hultman R, Hughes D, Michel N, Katz BM, Dzirasa K. Prefrontal cortex reactivity underlies trait vulnerability to chronic social defeat stress. *Nat. Commun.*, **5**, 4537 (2014)

主論文

1. Aizawa F, Nishinaka T, Yamashita T, Nakamoto K, Koyama Y, Kasuya F, Tokuyama S. Astrocytes Release Polyunsaturated Fatty Acids by Lipopolysaccharide Stimuli. *Biol. Pharm. Bull.*, **39**, 1100–1106 (2016)
2. Aizawa F, Nishinaka T, Yamashita T, Nakamoto K, Kurihara T, Hirasawa A, Kasuya F, Miyata A, Tokuyama S. GPR40/FFAR1 deficient mice increase noradrenaline levels in the brain and exhibit abnormal behavior. *J. Pharmacol. Sci.*, **132**, 249-254 (2016)
3. Aizawa F, Nakamoto K, Tokuyama S. The involvement of free fatty acid-GPR40/FFAR1 signaling in chronic social defeat stress-induced pain prolongation in C57BL/6J male mice. *Psychopharmacology*, **235**, 2335-2347 (2018)
4. Aizawa F, Sato S, Yamazaki F, Yao I, Yamashita T, Nakamoto K, Kasuya F, Setou M, Tokuyama S. N-3 fatty acids modulate repeated stress-evoked pain chronicity. *Brain Res.* (in press)