

予備審査の学位論文の要旨
(又は, 学位論文の要旨)

No...1...

論文題名 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	
氏 名 相澤 風花	(学籍番号若しくは 9415101 所属機関名)
主 論 文	
<p>1. <u>Aizawa F</u>, Nishinaka T, Yamashita T, Nakamoto K, Koyama Y, Kasuya F, Tokuyama S. Astrocytes Release Polyunsaturated Fatty Acids by Lipopolysaccharide Stimuli. <i>Biol. Pharm. Bull.</i>, 39, 1100–1106 (2016)</p> <p>2. <u>Aizawa F</u>, 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. <i>J. Pharmacol. Sci.</i>, 132, 249-254 (2016)</p> <p>3. <u>Aizawa F</u>, 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. <i>Psychopharmacology</i>, 235, 2335-2347 (2018)</p> <p>4. <u>Aizawa F</u>, 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. <i>Brain Res.</i> (in press)</p>	
要 旨	
<p>【背景】</p> <p>慢性疼痛は、「治療の期間を超えて持続する痛み」と表現されているように、組織が損傷から回復したにもかかわらず痛みが持続する。本邦では成人の約 5 人に 1 人が慢性疼痛に罹患しているとされ^{1,2)}、有効な治療法の確立やメカニズムの解明が急がれている。このような慢性的な痛みが持続することに伴って、不安障害やうつ病などの情動障害を併発するケースが多数報告されており、これらは慢性疼痛治療の妨げになっている³⁾。</p> <p>これまでに n-3 系脂肪酸の docosahexaenoic acid (DHA) は、抑うつ症状を軽減すること、また神経障害性疼痛を含む慢性疼痛を軽減させるとされている⁴⁾。実際に、慢性疼痛患者やうつ病患者の血中では、n-3 系脂肪酸が低下していること、疫学研究から n-3 系脂肪酸の摂取量が少ない人ほど、これら疾患に罹患しやすいことが示唆されている⁵⁾。このような背景から、脳内の n-3 系脂肪酸を介したシグナル機構は、慢性疼痛および情動障害の両者の制御に重要な役割を果たしている可能性が期待される。</p> <p>近年、DHA などの長鎖脂肪酸は脂肪酸受容体に作用し、さまざまな生理作用を発揮することがわかってきた。我々はこれまでに、脳内の脂肪酸受容体 G-protein coupled receptor 40/free fatty acid receptor 1 (GPR40/FFAR1) が、痛みの制御に関与していることを報告している⁶⁾。しかしながら、GPR40/FFAR1 が情動機能の異常に伴う痛みの慢性化機構に関与しているかについては不明である。</p> <p>そこで、本研究では、DHA-GPR40/FFAR1 シグナルが、情動機能異常およびそれに伴う痛みの慢性化機構に対する新たな治療標的となるかの検討を行った。</p>	

神戸学院大学大学院薬学

No...2...

【方法】

情動機能制御に対する GPR40/FFAR1 の関与についての検討には、C57BL/6J 系統の GPR40/FFAR1 野生型 (WT) および 欠損型 (GPR40^{KO}) 雄性マウスを用いた。不安様行動の解析には、高架式十字迷路試験およびオープンフィールド試験を、抑うつ様行動の解析には、スクロース嗜好性試験を、社会性行動の解析には、社会性相互作用試験を用いた。WT および GPR40^{KO} マウスの視床下部、中脳、延髄、海馬における serotonin, noradrenalin, dopamine 量は LC-MS/MS を用いて解析した。

In vitro の検討には、0-4 日齢の Wistar 系雌性ラット大脳皮質から作製した初代培養アストロサイトを用いた。形態変化は、GFAP の蛍光免疫染色によって評価した。LPS (100, 1000 ng/mL) を 24 時間処置し、LC-MS/MS による細胞および培養液中に含まれる遊離脂肪酸の解析、および real time-PCR による cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂)、calcium-independent phospholipase A₂ (iPLA₂) mRNA の測定を行った。

反復ストレス暴露によって誘導される慢性疼痛モデルマウスの作製には、C57BL/6J 雄性マウス (8 週齢) を使用した。まず、被験マウスを 10 日間連続して ICR マウスから直接および間接的なストレスを受ける社会的敗北ストレスに暴露し、その後マウスの右後肢足底部に術後痛を惹起した。社会性行動および不安様行動は、それぞれ社会性相互作用試験、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評価した。疼痛行動は、機械的刺激に対する過敏性を von Frey 試験を用いて評価した。脳内のリン脂質解析には Imaging-TOF/MS を用いた。n-3 系脂肪酸欠乏 (n-3 def) および対照 (control) マウスは、0% α -linolenic acid および 2.6% α -linolenic acid 含有食を自由摂食させ作製した。マウスは 10 日間の社会的敗北ストレスの暴露および術後痛処置を行い、情動行動および機械的痛覚閾値を測定した。GW1100 (GPR40/FFAR1 アンタゴニスト) は反復ストレス暴露期間中、浸透圧ポンプを用いて 1.0 μ g/12 μ L/mouse, 0.5 μ L/h の条件下で側脳室内に持続注入した。

【結果】

第一章：GPR40/FFAR1 knockout マウスにおける各種情動行動の解析

GPR40^{KO} マウスの不安様行動は、WT と比較して有意に減少した。GPR40^{KO} マウスの抑うつ様行動は、WT と比較して有意に増加した。GPR40^{KO} マウスの社会性行動には、何ら変化が認められなかった。GPR40^{KO} の serotonin および dopamine 量は、WT と比較して、海馬において有意に増加した。GPR40^{KO} の noradrenalin 量は WT と比較して、視床下部、中脳、延髄、海馬において有意に増加した。

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

LPS (100, 1,000 ng/mL) 処置は、vehicle 群と比較して、初代培養アストロサイトにおける GFAP 発現の増加、および細胞体の肥大化を誘導した。LPS 処置は、アストロサイト内において、palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linolenic acid, arachidonic acid、および DHA を有意に増加させた。一方で、LPS 処置後の細胞培養液中においては、DHA のみが有意に増加した。LPS 処置後のアストロサイトにおいて、cPLA₂ および iPLA₂ の mRNA 発現量は有意に増加した。

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

反復ストレスの暴露は、社会性の低下、不安様行動の増加を誘導した。ストレス非暴露下、術後痛処置に伴う機械的痛覚過敏は術後 7 日目に消失するのに対し、反復ストレス暴露下では術後 21 日目まで延長するストレス誘導性慢性疼痛モデルを作製した。反復ストレス暴露は、非暴露群と比較して、前頭前野、視床下部、中脳および延髄領域における palmitic acid、stearic acid、oleic acid、arachidonic acid、および DHA を含む phosphatidylcholine の動態を変化させた。さらに、ストレス誘導性慢性疼痛の形成期である術後痛惹起 7 日目の大脳皮質、視床下部、中脳および延髄領域においても、palmitic acid、stearic acid、oleic acid、arachidonic acid、および DHA を含む phosphatidylcholine の動態変化が認められた。

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

n-3 def マウスは、control マウスと比較して、脳内の DHA が有意に減少した。反復ストレス暴露によって生じる不安様行動は、control マウスと比較して、n-3 def マウスにおいてさらに増悪した。ストレス非暴露下、n-3 def マウスの機械的痛覚閾値は、control マウスと比較して、術後痛の惹起なしで両側性に有意に低下した。反復ストレス暴露下、術後痛処置に伴う機械的痛覚閾値の低下は control マウスでは、術後 28 日目に消失したのに対し、n-3 def マウスでは術後 49 日目まで延長した。

GPR40/FFAR1 アンタゴニストである GW1100 の脳室内持続注入は、反復ストレス暴露によって生じる社会性の低下および不安様行動に影響を示さなかった。一方で、反復ストレス暴露時に GW1100 を脳室内へ持続注入することによって、機械的痛覚過敏は術後 56 日目まで持続した。しかしながら、ストレス非暴露下においては、GW1100 の持続注入は、機械的痛覚過敏の持続を示さなかった。

【考察】

本研究において、脳内の GPR40/FFAR1 は情動制御に重要な役割を果たしていることを示した。また、GPR40/FFAR1 のリガンドとなる脂肪酸の脳内環境の制御因子として、アストロサイトがその一部を担っている可能性を明らかにした。社会的敗北ストレスの反復暴露は、不安の増加、社会性の低下などの情動障害を引き起こすと同時に、痛みを慢性化させることを見出し、ストレス暴露誘導性慢性疼痛モデルマウスの確立に成功した。また、ストレス誘導性慢性疼痛下では、脳内の種々のリン脂質の動態が著しく変化していることをイメージング解析技術を用いて明らかにした。さらに、脳内の DHA が減少した n-3 系脂肪酸欠乏マウスに対して反復ストレスを暴露すると、n-3 系脂肪酸が十分に存在するストレス非暴露群と比べて、情動機能異常および痛みの増悪が引き起こされることも確認した。これらの結果は、情動機能異常によって生じた脳内のリン脂質や脂肪酸の動態変化がその後生じる痛みの増悪および慢性化に関連していることを示唆する。一方、ストレス暴露時に、脂肪酸の標的となる受容体である脳内 GPR40/FFAR1 シグナルを抑制した際、痛みが慢性化することも明らかにした。これらの結果から、慢性ストレス暴露時には、脳内の脂質環境の変動に伴い DHA—GPR40/FFAR1 シグナルの機能低下が生じることで慢性疼痛が形成される可能性が考えられる。

慢性疼痛は、現在、痛みの治療のみならず、痛みに伴う情動機能や心理・社会的要因の改善を含めた集学的治療が推進されている。また、疼痛および情動の責任脳領域は共通であることが示唆されている。以上、本研究で得られた知見から、痛みと情動の両者を制御する脂肪酸—GPR40/FFAR1 シグナル機構は、情動障害を起因とする慢性疼痛に対する新たな治療標的となることが期待される。

【文 献】

1. 慢性疼痛治療ガイドライン, 「慢性の痛み診療・教育の基盤となるシステム構築に関する研究」研究班. (2018)
2. 矢吹 省司, 牛田 享宏, 竹下 克志, 佐浦 隆一, 小川 節郎, 勝俣 明子, 畠中 聡. 日本における慢性疼痛保有者の実態調査. *臨床整形外科*, **47**, 127-134 (2012)
3. Von Korff M and Simon G. The relationship between pain and depression. *Br. J. Psychiatry, Suppl.*, 101-108 (1996)
4. Ramsden CE, Zamora D, Makriyannis A, Wood JT, Mann JD, Faurot KR, MacIntosh BA, Majchrzak-Hong SF, Gross JR, Courville AB, Davis JM, Hibbeln JR. Diet-induced changes in n-3- and n-6-derived endocannabinoids and reductions in headache pain and psychological distress. *J. Pain*, **16**, 707-716 (2015)
5. 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)
6. Hibbeln JR. Fish consumption and major depression. *Lancet*, **351**, 1213 (1998)