

慢性疼痛に関与する LPA 合成酵素の役割と
その阻害薬探索に関する研究

2021

田中 景吾

目次

緒言	...	1
第一章 マウス神経障害性疼痛モデルにおける sPLA ₂ の関与と阻害薬の探索	...	4
実験方法	...	4
実験結果	...	10
第一節	神経障害性モデルマウスにおける神経傷害後の脊髄内 sPLA ₂ -IIIの発現上昇	
第二節	脊髄の sPLA ₂ -IIIノックダウンによる疼痛反応抑制効果	
第二節	ハイスループットスクリーニングによる sPLA ₂ -III阻害薬の探索と阻害薬の特性評価	
第四節	sPLA ₂ -III阻害薬投与による疼痛抑制効果	
考察	...	17
第二章 マウス FM モデルにおける LPA 合成酵素の関与の解明	...	20
実験方法	...	20
実験結果	...	24
第一節	IPS モデルにおける脳内 LPA の関与	
第二節	IPS モデルにおける視床下部の PLA ₂ 遺伝子発現変化	
第三節	sPLA ₂ -IIIノックアウトマウスによる効果	
第四節	sPLA ₂ -III阻害薬の脳室内投与による効果	
第五節	IPS モデルにおけるミクログリアの関与と疼痛との関与	
第六節	IPS モデルにおけるミクログリアと脾臓細胞誘発性疼痛との関与	
考察	...	33
総括及び結論	...	36

謝辞	...37
論文発表目録	...38
引用文献	...39

緒言

痛みは大きく分類すると急性痛と慢性痛に区分され、有害刺激や炎症による急性痛は臨床では抗炎症剤やオピオイドによって対処される。一方、難治性の慢性痛として、神経障害性疼痛や線維筋痛症 (fibromyalgia : FM) などが挙げられる。これら慢性痛は非ステロイド性抗炎症薬 (non-steroidal anti-inflammatory drugs : NSAIDs)、オピオイド、手術など、古典的で一般的に使用されている鎮痛薬レジメンに反応しない難治性の疾患も多い。現在は抗てんかん薬や抗うつ薬により治療が行われているが[1,2]、根本的な治療薬ではなく、対症療法の域にとどまっている。また、有効性や副作用の観点からも満足のいく治療はなされていないのが現状であり[3,4]、その発症メカニズム及び治療薬の開発が強く求められている。

私の所属する研究グループは、生理活性脂質であるリゾホスファチジン酸 (lysophosphatidic acid : LPA) が LPA 受容体 type 1 (LPAR₁) を介したシグナルを介し、多くの慢性疼痛疾患において関与することを明らかにしてきた[5-8]。LPA は細胞膜に存在するホスファチジルコリン (phosphatidyl choline : PC) がホスホリパーゼ A2 (phospholipase A2 : PLA₂) により分解されることでリゾホスファチジルコリン (lysophosphatidyl choline : LPC) となり、さらに LPC がオートタキシン (autotaxin : ATX) により分解されることで LPA となる。これまでの研究から神経障害性疼痛モデルや FM モデルにおいて LPAR₁ 欠損 (LPAR₁-KO) マウスでは疼痛反応が抑制されることを明らかにしてきており[9,10]、痛みにおける LPA シグナルの制御は慢性疼痛に対する新規治療薬のターゲットの候補となる可能性があると考えられる。しかし、病態時における LPA 合成機構の制御が慢性疼痛疾患にどのような影響を及ぼすかについては明らかとなっていない。そこで私は病態特異的な LPA 合成に関わる酵素群に着目し検討を行った。

第一章ではマウス神経障害性疼痛モデルを使用し検討を行った。神経障害性疼痛において、これまで3種に分類される PLA₂のうち細胞内酵素であるカルシウム依存型酵素である cPLA₂(cytosolic PLA₂)とカルシウム非依存型酵素である iPLA₂(calcium-independent PLA₂)の関与は明らかとなっている。そこで、新たに細胞外分泌型酵素である sPLA₂ (secretory PLA₂) と疼痛との関与の検討を行ったところ、sPLA₂-IIIが疼痛に関与することを明らかにした。また、sPLA₂-III阻害薬の探索を行い、sPLA₂-III阻害薬は治療効果を示すことを明らかにした。

第二章では FM モデルである断続的精神的ストレス (intermittent psychological stress : IPS) モデルを使用し、LPA 合成酵素の関与の検討を行った。その結果、IPS モデルの脳内で sPLA₂-IIIおよびミクログリアが疼痛に関与することを明らかにした。

これらは慢性疼痛における LPA 合成酵素の役割の一端を明らかにし、難治性の慢性疼痛における治療薬の開発のための新たな標的となる可能性が考えられる。これらの研究成果について、以下に論述する。

なお、本文中及び図中で使用した略語は以下の通りである。

AAV	adeno-associated virus
aCSF	Artificial cerebrospinal fluid
AS-ODN	antisense oligodeoxynucleotide
ATX	autotaxin
CeA	central amygdaloid nucleus
DDI	drug discovery initiative
DMSO	dimethyl sulfoxide
DRG	dorsal root ganglia
EmGFP	emerald green fluorescent protein
EPW	electrical stimulation-induced paw withdrawal
FBS	fetal bovine serum
FM	fibromyalgia
HPA axis	hypothalamic-pituitary-adrenal axis
HTS	high-throughput screening
i.c.v.	intracerebroventricular
IgG	immunoglobulin G
i.p.	intraperitoneal
IPS	intermittent psychological stress
i.t.	intrathecal
I-TASSER	iterative threading assembly refinement
KO	knockout
LC-MS	liquid chromatography – mass spectrometry
LPA	lysophosphatidic acid
LPAR	lysophosphatidic acid receptor
LPC	lysophosphatidylcholine
Luf	luffariellolide
MOE	molecular operating environment
mRNA	messenger ribonucleic acid
MS-ODN	missense oligodeoxynucleotide
NK1	neurokinin 1
NMDA	N-methyl-D-aspartic acid
NSAIDs	non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs
PBS	phosphate buffered saline
PC	phosphatidylcholine

PCR	polymerase chain reaction
PLA ₂	phospholipase A2
pSNL	partial sciatic nerve ligation
PTSD	posttraumatic stress disorder
PVN	paraventricular hypothalamic nucleus
PWT	paw withdrawal threshold
RNA	ribonucleic acid
ROS	reactive oxygen species
SREBP1	sterol regulatory element-binding protein 1
SP	substance P
Var	varespladib
WT	wild type

第一章

マウス神経障害性疼痛モデルにおける sPLA₂の関与と阻害薬の探索

神経障害性疼痛とは人口の 3-17%に見られ、末梢神経の損傷により、慢性的な痛みを生じる難治性の慢性疼痛である。部分的な坐骨神経結紮 (partial sciatic nerve ligation : pSNL) によって誘発される神経障害性疼痛の一連の報告では、神経損傷は脊髄後角で LPA 産生を引き起こし、LPA はミクログリアに働き、サイトカインなどの産生を介して LPA 産生の自己増幅を引き起こすことが示唆されてきた。産生された LPA は LPAR₁ を介した脊髄後根の脱髄と、後根神経節 (dorsal root ganglia : DRG) における Cav α 2 δ 1 の発現上昇を誘発し、それぞれアロディニアと痛覚過敏に関与すると考えられている [9,11,12]。最近の報告では、pSNL によって誘発される LPA 産生は 2 週間後においても観察され、LPAR₁ および LPAR₃ アンタゴニストの反復投与は、神経傷害による慢性的な疼痛を抑制することが明らかとされており [5]、LPA 産生の調節が神経障害性疼痛の治療標的になることが提唱されてきた。

神経障害性疼痛モデルにおいて、神経が損傷すると疼痛伝達物質サブスタンス P (SP) やグルタミン酸 (Glu) によるそれぞれ NK1 と NMDA 受容体を介した強度な同時刺激によって脊髄後角における cPLA₂、iPLA₂の活性化が傷害後 1 時間で最大となり、初期 LPA 産生につながるとされ、慢性疼痛の初期メカニズムに貢献することが証明されてきた [13]。しかし、LPA 産生は 2 週間以降も継続するにも関わらず、cPLA₂、iPLA₂の活性は傷害後 6 時間以内に低下していること、ならびに傷害後 6 時間以降の cPLA₂、iPLA₂阻害薬の投与による治療効果は観察されなかったという事実から、cPLA₂、iPLA₂のみではなく sPLA₂にも疼痛形成や維持に関与する可能性があると考え、本研究を実施した。

実験方法

実験動物および実験環境

すべての実験は、京都大学動物実験委員会の倫理ガイドラインに従って実施した。雄の C57BL/6J マウス (5~8 週齢、20~30 g) は日本 SLC から購入した。すべてのマウスは、12 時間の明暗周期の下で室温が 22 \pm 2°Cのもとで飼育され、水および飼料は自由に摂取させた。

部分坐骨神経結紮 (pSNL) モデル

坐骨神経の部分的結紮は、塩酸メドミジン (0.5 mg/kg)、ミダゾラム (4 mg/kg)、および酒石酸ブトルファノール (5 mg/kg) を混合した 3 種混合麻酔薬を腹腔内 (i.p.) 投与し、麻酔下で行った。

既報に従い、坐骨神経部分結紮 (partial sciatic nerve ligation; pSNL) モデルを作製した [14,15]。まず右大腿部の毛をバリカンで刈り、皮膚を約 1 cm 切開した後、坐骨神経を露出させた。坐骨神経の 1/2-1/3 を眼下丸 00000 バネ夏目縫合針 (株式会社夏目製作所) および 9-0 号バージンシルク (株式会社河野製作所) で結紮した。その後、切開した皮膚を絹製縫合糸 (株式会社村瀬縫合糸) で縫合した。

組織回収およびリアルタイム PCR

pSNL 後のさまざまな時点 (6 時間から 7 日) で同側または対側にある腰椎 (L4-L6) 脊髓の片側後角 (薄層 IV) を、直ちに液体窒素で凍結し、使用するまで -80°C で保存した。RNA 抽出および real-time qPCR は既報に従って行った [16]。RNA は ISOGEN 試薬 (株式会社ニッポンジーン) を使用して、仕様書に従って分離し、cDNA は 1 μ g の全 RNA から ReverTraAce[®] (東洋紡) を使用して逆転写を行った。qPCR は THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡) を用い全量 20 μ L に調整後、Step One リアルタイム PCR システム (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を使用して、95°C で 10 分間加熱した後、95°C で 10 秒間および 60°C で 1 分間を 40 サイクルのプログラムで行った。また、内在性コントロールとして GAPDH を用い標準化を行った。使用したプライマーは北海道システム・サイエンス株式会社または Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入し、以下の表に記載した。

	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
cPLA ₂ α	GTGAGGGGCTTTATTCCACA	ACACCAGAGAATCCCACCAT
iPLA ₂ β	GTCACCTGGACCCTGCTTAG	TCCGAAGAACTGCATCCTCT
sPLA ₂ -IB	TCCCCTGAAGGATTACAACAA	GTAGCAGTGGTCATGAGTCTGG
sPLA ₂ -IIA	GCTGTGTTACTCATGACTGTTGC	GACAGGAGTTCTGGTTTGACAG
sPLA ₂ -IIC	AAAGGGCTCCCTGTGGAT	TGGGTTGGCAGCCATATT
sPLA ₂ -IID	TCCCAGGGCACTATCCAGT	GCTATCCAGGTTTTGCTTCAA
sPLA ₂ -IIE	AGCTTGACAGTACCCAGATGC	TTTCATCCTGGGGGAGGT
sPLA ₂ -IIF	CTTTGCCATCGCAGTCCT	CACCATGGACTTCAGGTTTCAG
sPLA ₂ -III	TCCTCCAGACCTGATATGATCC	ACAGACTCGGTGGGCACT
sPLA ₂ -V	CTATGGCTTCTACGGCTGCT	AACAACGGTCGTGCATCTG

sPLA ₂ -X	CTGTTGCTGCTGGGACCT	CCAGGAGTCCACGCTTGTAT
GAPDH	TGTCGTCGTGGATCTGAC	CCTGCTTCACCACCTTCTTG

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの作成

pAAV-CMV-EmGFP-miRNA-backbone の調製のために、CMV プロモーター、EmGFP 遺伝子、miRNA 発現カセット、およびチミジンキナーゼポリ A シグナルを含む遺伝子断片を pcDNA™6.2-GW / EmGFP- miR vector (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) から PCR により増幅した。それらを NheI / NotI で処理し、pX601-AAV-CMV :: NLS-SaCas 9-NLS-3xHA-bGHpA; U6 :: BsaI-sgRNA vector (Addgene, Cambridge, MA) [17] に XbaI / NotI で処理を行った pAAV 骨格に対し ligation を行った。pAAV-CMV-EmGFP-sPLA₂-III-miRNA の作成には、sPLA₂-III (NM_172791.2) に対する miRNA 配列 (sense : 5'-TGCTGAAAGCCAGCACTCCTAGAAGTGT TTTGGCCACTGACTGACACTTCTAGG TGCTGGCTTT-3', antisense : 5'- CCTGAAAGCCAGCACCTAGAAGTGT CAGTCAGT GGCCAAAACACTTCTAGGAGTGCTGGCTTTC-3') を BLOCK-iT™ RNAi Designer (<https://rnaidesigner.thermofisher.com/rnaiexpress/>) によってデザインを行った。pAAV-CMV-EmGFP-negative control -miRNA の作成には、negative control 配列 (sense : 5'-T GCTGAAATGTACTGCGCGTGGAGACGTT TTTGGCCACTGACTGACGTCTCCACGC AGTACATTT-3', antisense : 5'- CCTGAAATGTACTGCGTGGAGACGTCAGTCAGT GGCCAAAACGTCTCCACGCGCAGTACATTTTC -3') を pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR-neg Control (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) からデザインした。オリゴデオキシヌクレオチドは北海道システム・サイエンス株式会社から購入し、センス鎖とアンチセンス鎖をハイブリダイズさせ、BsaI で消化した pAAV-CMV-EmGFP-miRNA-backbone にクローニングした。

AAV ベクター精製

AAV ベクターは AAV Helper-Free System (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) を用いて作製し、既報のように精製した [18]。Lent-X 293T (Clontech, Mountain View, CA, USA) 細胞に、ポリエチレンイミン (Polysciences, Warrington, PA, USA) を用いてトランスフェクションを行った。3日後、トランスフェクションを行った細胞を収集し、人工脳脊髄液 (aCSF; 124 mM NaCl, 3 mM KCl, 26 mM NaHCO₃, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 1.25 mM KH₂PO₄, および 10mM D-グルコース) に再懸濁した。細胞を4回の凍結融解サイクルで破壊し、溶解物をベンゾナーゼヌクレアーゼ (Sigma-Aldrich, MO, USA) で 45°C、15 分間処理した後、14,000 rpm で 10 分間の遠心分離により細胞破片を除去し、AAV ベクターを含む上清は 80°C で保存した。AAV の力価は qPCR によって測定し、

約 4.0×10^{13} vg/mL であった。

AAV の脊髄内投与

AAV の脊髄内投与は既報に従った[19]。麻酔後、皮膚を Th12-L3 で切開し、脊柱の吻側と尾側の部位を固定した。脊椎周辺の不要な筋肉を取り除き、硬膜とくも膜を 30 G の針で注意深く切開し、マイクロキャピラリー (GD-1、ナリシゲ) に充填された 500~600 nL の AAV 溶液を、脊髄後角の実質 (正中線から横方向に約 500 μ m、表面から深さ 250 μ m) に FemtoJet Express (Eppendorf、NY、USA) を使用して、600 hPa、60 秒で投与した。投与 4 週間後、動物を麻酔し、pH 7.4、0.1 M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) と 4% パラホルムアルデヒド (ナカライテスク) で経心灌流を行った。灌流固定後、脊髄を採取し、PBS 中の 15% スクロースに一晩浸した後凍結した。組織はクリオスタット (LEICA3000; Leica, Germany) を使用して切片化し (厚さ 14 μ m)、 -80°C で保存した。次に、切片を PBS で洗浄し、Fluoromount/Plus (Diagnostic Biosystems、Pleasanton、CA、USA) を使用してガラスに封入し、免疫蛍光はレーザー走査型共焦点顕微鏡 (Fluoview FV10i、オリンパス) を使用して観察した。

疼痛評価

疼痛評価は既報に従った[8,11,20,21]。機械性疼痛評価 (mechanical paw pressure test) では、以前に報告したようにマウスを 6×6 mm の金網グリッド床のプレキシガラスチャンバーに入れ、1 時間順応させた[22]。次に、電子痛覚測定装置 (Model 2390, 90 g probe; IITC Inc., Woodland Hills, CA, USA) を使用し、右後足の足底表面の中央に機械的疼痛刺激を与え、足の屈筋反応を誘発するのに必要な圧力を痛み閾値として測定した。

熱性疼痛閾値は、マウスをガラス上にあるケージに入れ、1 時間順応後、熱刺激装置 (IITC Inc., Woodland Hills, CA, USA) を用い、測定した。組織の損傷を防ぐために、20 秒のカットオフタイムを使用し、熱刺激による足の逃避行動に基づいて評価した[23,24]。

EPW (electrical stimulation-induced paw withdrawal) テストでは、Neurometer Current Perception Threshold / C (Neurotron Inc., Baltimore, MD, United States) の電極を後足に挟み刺激を行った。3 つの正弦波パルス (5、250、および 2000 Hz) のそれぞれによる経皮神経刺激は、それぞれ C 線維、 $A\delta$ 線維および $A\beta$ 線維を活性化すると考えられており[25-27]、各マウスが足を引っ込めた最小強度を侵害受容電流閾値として評価した。

AS-ODN と siRNA を使用した実験

i.t.投与は既報に従い、覚醒下のマウスの脊椎 L5-L6 の間に注射を行った[28]。i.c.v.投与は既報に従って、覚醒下のマウスの右側脳室に投与を行った[29]。sPLA₂-III に対する anti-sense oligodeoxynucleotide (AS-ODN ; 5'-GTACCCCAGGACCCCATTCTACTCTAG-3') とその mismatch scramble oligodeoxynucleotide (MS-ODN ; 5'-GATCTCCCTCGT

CCCCCTAAGAACCCATG-3') は Sigma-Aldrich (MO, USA) から購入した。AS-ODN および MS-ODN は、人工脳脊髄液 (aCSF; 125 mM NaCl, 3.8 mM KCl, 2.0 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃, 10 mM グルコース, pH 7.4) に溶解した。AS-ODN または MS-ODN は、pSNL の 5 日後から 11 日後まで、10 μg/5 μL で髄腔内または脳室内に投与した。また siRNA 投与は JetSI (Polyplus-transfection S A, Illkirch, France) を使用し、既報に従い 5 μL (0.1 μg/μL) の用量で髄腔内投与した [30]。本研究では、3 セットの sPLA₂-III siRNA の混合物 (MISSION siRNA, SASI_Mm01_00031683, SASI_Mm02_00344692, SASI_Mm02_00344693; Sigma-Aldrich, MO, USA) およびコントロール siRNA (MISSION siRNA Universal Negative Control#1, SIC-01-10; Sigma-Aldrich, MO, USA) を使用した。

sPLA₂-III 阻害薬のスクリーニング

長崎大学 植田弘師教授らに行っていただいた。ChEMBL データベースから PLA₂活性の阻害を示す化合物を選択し、molecular operating environment (MOE) を用いたトポロジカルフィンガープリントを使用して同様の構造を計算した。東京大学創薬機構 (Drug Discovery Initiative : DDI) に保存されている 21 万の化合物からなるライブラリーから化合物を抽出し、Iterative Threading ASSEMBLY Refinement (I-TASSER) と構造を使用して、蜂毒 PLA₂ グループ III の結晶構造に基づくドッキングスクリーニングおよび、MOE における structure-based drug design GOLD を使用して 2401 の化合物に絞り込み、PLA₂ 阻害剤アッセイのハイスループットスクリーニング (HTS) に使用した。HTS には東京大学 村上誠教授からいただいたバキュロウイルスベクターを発現する Sf9 細胞の上清から得られた組み換えヒト sPLA₂-III-S タンパクを使用した [31]。特異性評価には Lent-X 293T 細胞 (Clontech, Mountain View, CA, USA) に Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用い pRC-CMV-sPLA₂-III-S [32] をトランスフェクションし、培養上清を用いた。

cPLA₂ α 精製

cPLA₂ α 精製は ALFA-tag による方法を用いた [33]。ALFA マウス cPLA₂ α フラグメントは、プライマー (5'-ACATCTAGATGCCAGTAGACTGGAAGAGGAGCTTCGAAGACGCTTGACAGAACCTTTTCTGGTGGAAACACCAGTA-3' および 5'-ACACTCGAGTTACACAGTGGGTTTACTTA-3') を使用し、PCR によって増幅した。このフラグメントを XbaI / XhoI で消化し、同様に XbaI / XhoI で処理した pCAG-EGFP (Addgene, Cambridge, MA, USA) の骨格にライゲーションした。ALFA マウス cPLA₂ α プラスミドを Lent-X 293T 細胞にトランスフェクションしてから 3 日後に細胞を回収し、1 mM PMSF およびプロテアーゼ阻害剤カクテル (ナカライテスク) を含む溶解バッファー (pH 8.0, 20 mM Tris, 0.1% Triton X100, 200 mM NaCl) で超音波処理した。15,000×g, 4°C, 10 分遠心分離し、上清を回収した後、上清を ALFA-selector PE レジン (Nanotag Biotechnologie

s, Göttingen, Germany) に加え、4°Cで1時間混合させた。1分間遠心分離して上清を除去した後、レジンを溶解バッファーとPBSで3回洗浄した。ALFA 溶出ペプチド (Nanotag Biotechnologies, Göttingen, Germany) を含む溶解バッファー (50 μ L) をレジンに添加し、室温で20分間振とうしながらインキュベートした。その後、混合物を1,000 \times gで1分間遠心分離して、cPLA₂ α を収集した。

PLA₂アッセイ

ヒット化合物#29: {[(1Z) -2-amino-2- (3-{2-[(phenylamino) thioxomethyl]hydrazino}pyrazin-2-yl) -1-azavinyl]amino} (phenylamino) methane-1-thione および#107: (5-phenyl-2-[(prop-2-enylamino) thioxomethyl]amino) (3-thienyl) -N-[(prop-2-enylamino) thioxomethyl] amino}carboxamide は Rare Chemicals GmbH (Germany) and Butt Park (Bath, UK) から購入した。また、sPLA₂阻害薬である Varespladib、Luffariellolide は Santa Cruz (California, USA) から購入した。組み換えヒト sPLA₂ -IIA は R&D Systems (St. Louis, MO)、組み換えマウス sPLA₂-V は Abcam (Cambridge, UK)、組み換えヒト iPLA₂ β は Origene (MD, USA)、PLA₁ は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入し特性を評価した。PLA₂活性の阻害を評価するために、化合物、各酵素および Bis-BODIPY™ FL C11-PC (1.65 μ M; Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を PLA₂反応バッファー (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, pH 8.9) に加え 37°Cで1時間反応させた。最終反応容量は 20 μ l とし、反応後、マイクロプレートリーダーを使用して励起光 488 nm、蛍光を 530 nm で測定した。

阻害薬投与

阻害薬は pSNL 後 5 日目から 7 日間にわたり、腹腔内投与 (i.p. : 10 mg/kg) を行った。また、pSNL の 30 分前に髄腔内投与 (i.t. : 10 nmol/5 μ L) を行った。i.p.投与では生理食塩水に 30%のポリエチレングリコールとなるよう溶解し、i.t.投与では 5%ジメチルスルホキシド (DMSO) を含む aCSF を調製し、投与した。

統計分析

全てのデータは平均値 \pm 標準誤差で表示した。統計処理は Student の t 検定もしくは、one-way ANOVA または two-way ANOVA の後 Bonferroni、Tukey、もしくは Dunnett 検定を用いて、GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) で解析した。また、危険率が 5%未満の際に統計学的な有意差があると判定した。

実験結果

第一節 神経障害性モデルマウスにおける神経傷害後の脊髄内 sPLA₂-III の発現上昇

sPLA₂ は一般に約 14-18 kDa の低分子量の分泌酵素で、これまでに哺乳動物では 10 種類の活性型分子種 (IB, II A, II C, II D, II E, II F, III, V, X, XII A) が同定されている。まず、脊髄に発現する主な PLA₂ を特定するためにリアルタイム PCR により、ナイーブマウスの脊髄後角における各 PLA₂ 種の遺伝子発現の検討を行った (図 1-1A)。その結果 sPLA₂ における各種遺伝子発現は sPLA₂-V > sPLA₂-III > sPLA₂-II F の順で主に発現をしており、その他のアイソフォームは 10 分の 1 以下もしくは発現が見られなかった。また、cPLA₂ α、iPLA₂ β とともに sPLA₂-V, III, II F と同程度発現が確認された。

神経障害後に関与する PLA₂ を特定するため、PLA₂ 各種の遺伝子発現を pSNL 後のさまざまな時点で測定したところ、sPLA₂-III の発現は神経傷害側の脊髄後角では 6、12、および 24 時間後に顕著な増加を示したが、反対側では増加はみられなかった (図 1-1B)。しかし、他の PLA₂ 分子 (cPLA₂ α、iPLA₂ β、sPLA₂-IB、sPLA₂-II C、sPLA₂-II D、sPLA₂-II F、sPLA₂-V) の発現の増加は、神経損傷後のどの時点でも観察されず (図 1-1C-I)、神経損傷後 6 時間で cPLA₂ α のみ発現の一時的な減少が見られた (図 1-1C)。

第二節 脊髄の sPLA₂-III ノックダウンによる疼痛反応抑制効果

実際に神経障害性疼痛に sPLA₂-III が関与しているかどうかを検討するために sPLA₂-III に対する miRNA を発現する AAV-EmGFP-sPLA₂-III miRNA を作成した。AAV-EmGFP-sPLA₂-III miRNA を脊髄後角実質に投与を行ったところ、4 週間後に同側脊髄後角の灰白質ではっきりと緑色蛍光が観察され、脊髄前角でもわずかに観察された。一方で反対側ではほとんど蛍光は見られなかった (図 1-2A)。また、脊髄後角に miRNA を投与した 4 週間後、リアルタイム PCR により sPLA₂-III 遺伝子発現を検討したところ、control miRNA と比較して減少がみられた (図 1-2B)。

脊髄内 sPLA₂-III ノックダウンにより痛みが抑制されるかどうかを検討するために pSNL の 4 週間前に control または sPLA₂-III-miRNA を用いて脊髄後角の実質に投与し、pSNL 処置 14 日後 (P14) に各種痛み試験を実施した。図 2C-G に示すように、pSNL 処置 1 日前の疼痛閾値は、機械性疼痛試験、熱性疼痛試験および 2000、250、または 5 Hz の EPW テストでは control および AAV-EmGFP-sPLA₂-III miRNA との間に差はみられなかった。pSNL 後 14 日では機械性、熱性、2000、または 250 Hz の電気刺激による疼痛閾値の減少が、AAV-EmGFP-negative control miRNA を投与したマウスで観察され、5 Hz の刺激による閾値の増加が観察された (図 1-2C-G)。一方、sPLA₂-III-miRNA の投与を行ったマウスではこれら疼痛閾値の変化は抑制された。

また、アンチセンスオリゴヌクレオチド (AS-ODN) と siRNA を用い、同様に疼痛への

影響を検討した。pSNL 後 5 日目から毎日 sPLA₂-III の AS-ODN の髄腔内 (i.t.) 投与を計 7 回行い、投与開始から 2 日おきに AS-ODN 投与の 30 分前に疼痛評価を行ったところ、P8 で疼痛反応の抑制が観察され、P12 でその抑制効果は最大となった。また、AS-ODN 投与終了後の P14 と P16 でも依然として疼痛抑制が観察された。一方、ミスマッチスクランブル ODN (MS-ODN) を投与した群では pSNL によって生じた疼痛閾値の低下は抑制されなかった (図 1-2H)。脳内にも sPLA₂-III は発現しており、脳における sPLA₂-III の関与の可能性も考えられたため、AS-ODN の反復脳室内 (i.c.v.) 投与を行い、疼痛評価を行ったところ、熱性疼痛反応に影響を及ぼさなかった (図 1-2I)。一方、P5 で sPLA₂-III siRNA の単回投与を行ったところ、P8 で治療効果が観察された (図 1-2J)。

第三節 ハイスクリーンによる sPLA₂-III 阻害薬の探索と阻害薬の特性評価

sPLA₂-III およびその他のアイソフォームの酵素活性を評価するための HTS アッセイには、各蛍光 BODIPY 残基の消光現象により蛍光が消失している bis-bodipy-phosphatidyl choline (bis-bodipy-PC) を基質として使用し、sPLA₂-III が bis-bodipy-PC に作用すると、消光が失われ、蛍光が時間依存的に現れることで、酵素活性を評価できる系を用いた。共同研究者である長崎大学植田らはスクリーニングの開始時に、東京大学創薬機構の化合物ライブラリーを用い、21 万化合物から 2401 の化合物を最初に選択し、そのうち阻害効果の最も高かった 2 つの化合物 #29 と #107 を見出した (図 1-3A)。得られた #29、#107 の特異性を検証するために、これまで十分に解析されてこなかった市販の sPLA₂ 阻害薬である Luffariellolide および Varespladib (図 1-3B) とともに関連酵素に対する阻害活性を比較検討した。これら阻害薬の sPLA₂-II A、sPLA₂-III、sPLA₂-V、cPLA₂ α、iPLA₂ β、および PLA₁ に対する IC₅₀ の結果は図 1-3C に示したとおりである。これらの成績から、sPLA₂-III に対する阻害効果は、#29 が最も強力であり、次いで Luffariellolide、#107 であった。一方で Varespladib には sPLA₂-III に対する阻害効果はみられなかった。その他の酵素群に対して、#29 は sPLA₂-II A および iPLA₂ β に対して阻害効果がみられ、#107 は 4.4~42.2 μM の範囲で検討したすべての PLA₂ を阻害した一方で、#29 および #107 はともに PLA₁ は阻害しなかった。興味深いことに、Luffariellolide は iPLA₂ β に対し阻害効果はなく、sPLA₂-V に対する阻害効果は非常に弱く示した。

第四節 sPLA₂-III 阻害薬投与による疼痛抑制効果

次にこれら阻害薬を用い、pSNL による疼痛が #29、#107、Luffariellolide、および Varespladib で抑制されるかどうか検討を行うため、pSNL 処置の 30 分前にこれら阻害薬の髄腔内投与を行った。その結果、図 1-4A に示すように損傷後 14 日目 (P14) における機械性疼痛、熱性疼痛および EPW テストの 2000 Hz、250 Hz の疼痛反応を #29、#107 および Luffariellolide は抑制した一方で、Varespladib は抑制しなかった (図 1-4A-D)。また、EPW

テストの 5 Hz による C 線維鈍磨に対しても、#29、#107、Luffarielollide は抑制効果を示し、Varespladib では抑制しなかった (図 1-4E)。#29 は cPLA₂α に対する阻害作用はなく、Luffarielollide は cPLA₂α と iPLA₂β に対する阻害作用を有さない。このことから #29、#107 および Luffarielollide の疼痛抑制効果は、cPLA₂α または iPLA₂β の阻害に起因しないと考えられる。さらに、sPLA₂-II A および sPLA₂-V に対し強力な阻害を示す Varespladib では影響が見られなかったことから、sPLA₂-II A および sPLA₂-V の阻害によるものではないと考えられる。

また、治療効果についても検討を行うため、pSNL 処置後、P5 から P11 において #29、#107 の連続腹腔内投与を行い、熱性疼痛試験を行ったところ、P11 における疼痛反応は抑制された (図 1-4F)。

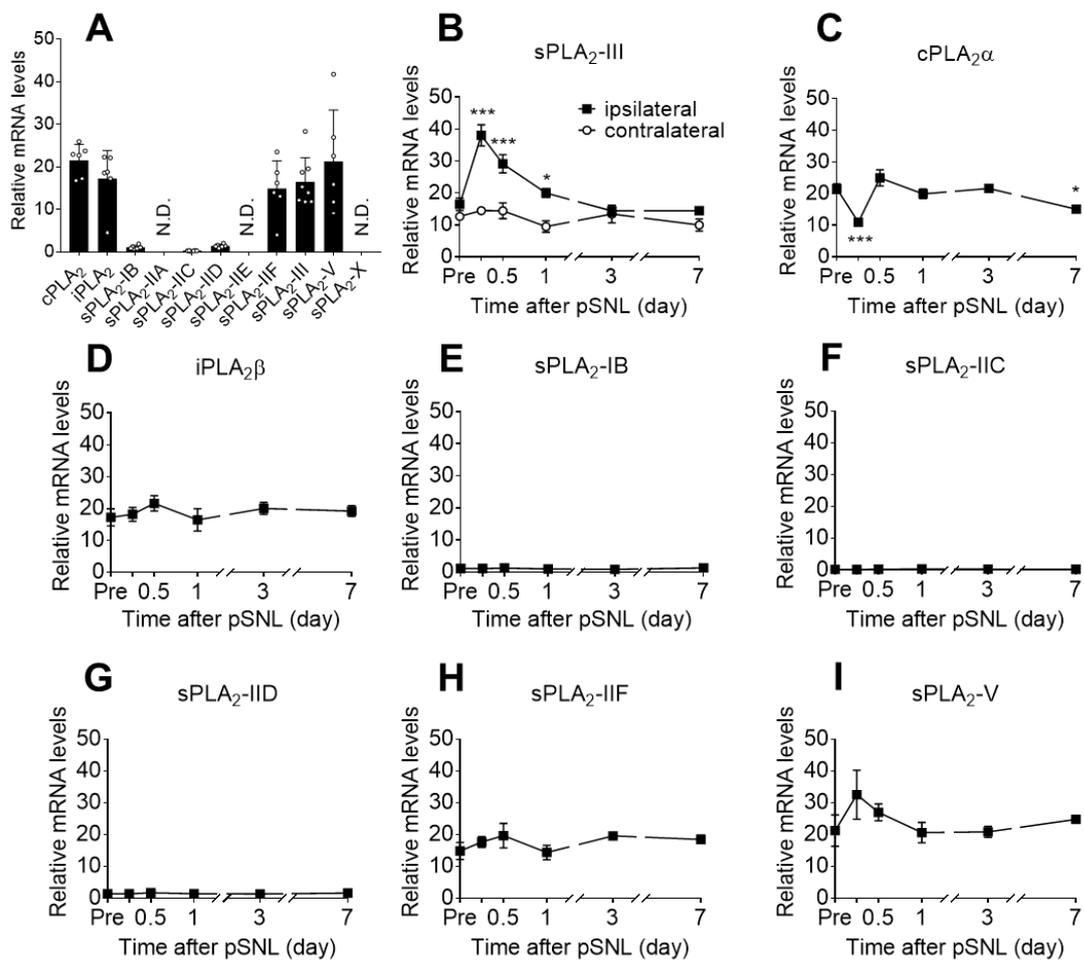


図 1-1 pSNL 処置による脊髄後角における各 PLA₂遺伝子発現変化

(A) ナイーブマウスにおける脊髄後角の各 PLA₂遺伝子発現。n=6-8。 (B-I) pSNL処置後、6時間から7日における脊髄後角の傷害側および反対側の sPLA₂-III 遺伝子発現変化

(B)、および各 PLA₂遺伝子発現変化 (C-I)。n=4-8, ****P* < 0.001 vs Pre. 各 PLA₂の相対的 mRNA量は GAPDH mRNA量の $\times 10^{-4}$ で表した。

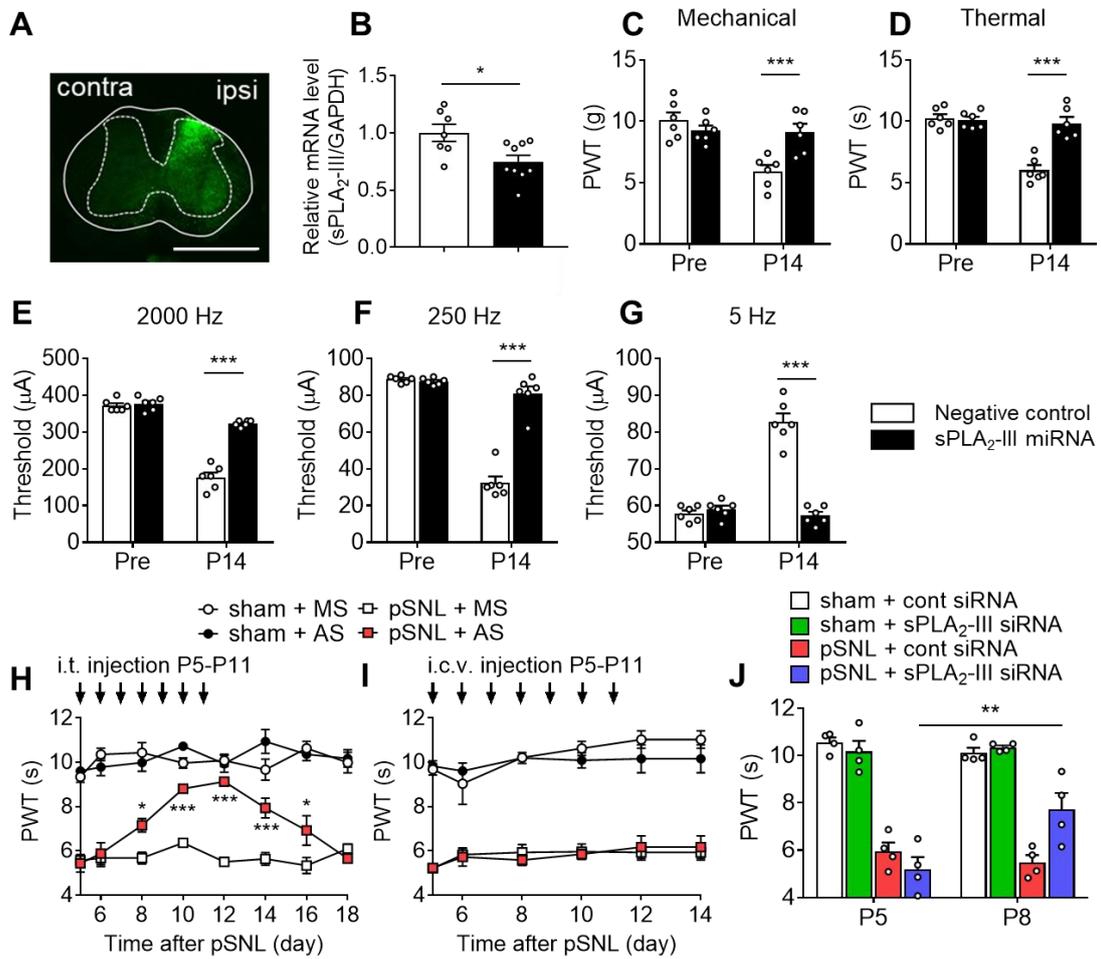


図 1-2 脊髄における sPLA₂-III ノックダウンは神経障害後の疼痛反応を抑制した

(A) AAV-EmGFP- sPLA₂-III -miRNA の脊髄における発現。スケールバー：1 mm。 (B) AAV-EmGFP- sPLA₂-III -miRNA および AAV-EmGFP- negative control 投与 4 週間後における脊髄 sPLA₂-III の遺伝子発現の低下。n=7-9, **P*< 0.05 vs negative control. (C-G) AAV-EmGFP- sPLA₂-III -miRNA 投与による機械性疼痛 (C)、熱性疼痛 (D)、EPW テストの 2000 Hz (E)、250 Hz (F)、5 Hz (G)、の疼痛反応をそれぞれ評価した。n = 6, ****P*< 0.001 vs negative control. (H,I) AS-ODN の P5-P11 における髄腔内投与 (H) および脳室内投与 (I) による熱性疼痛反応への影響。n = 3-4, **P*< 0.05, ****P*< 0.001 vs pSNL+MS-ODN. (J) P5 における髄腔内 siRNA 投与による熱性疼痛反応への影響。n = 4, ***P*< 0.01 vs pSNL+cont siRNA.

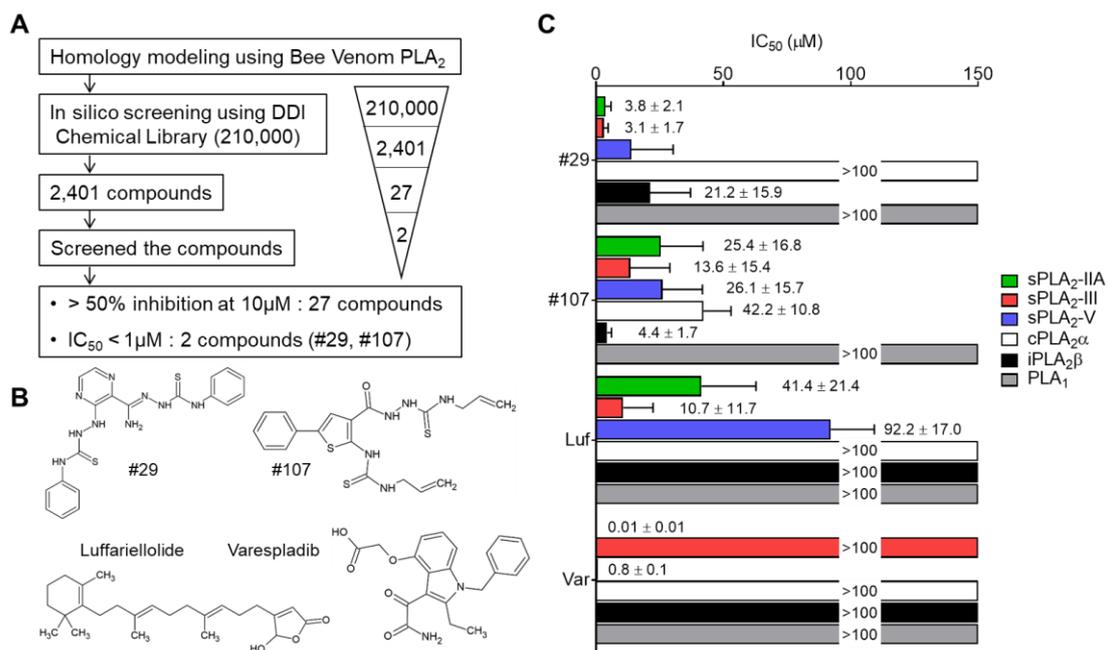


図 1-3 HTS および sPLA₂ 阻害薬の特性評価

(A) HTS のフローチャート。(B) #29、#107、Luffarielloide (Luf) および Varespladib (Var) の化学構造式。(C) 5 つの PLA₂ アイソフォームおよび PLA₁ に対する 4 化合物の IC₅₀ 比較検討。

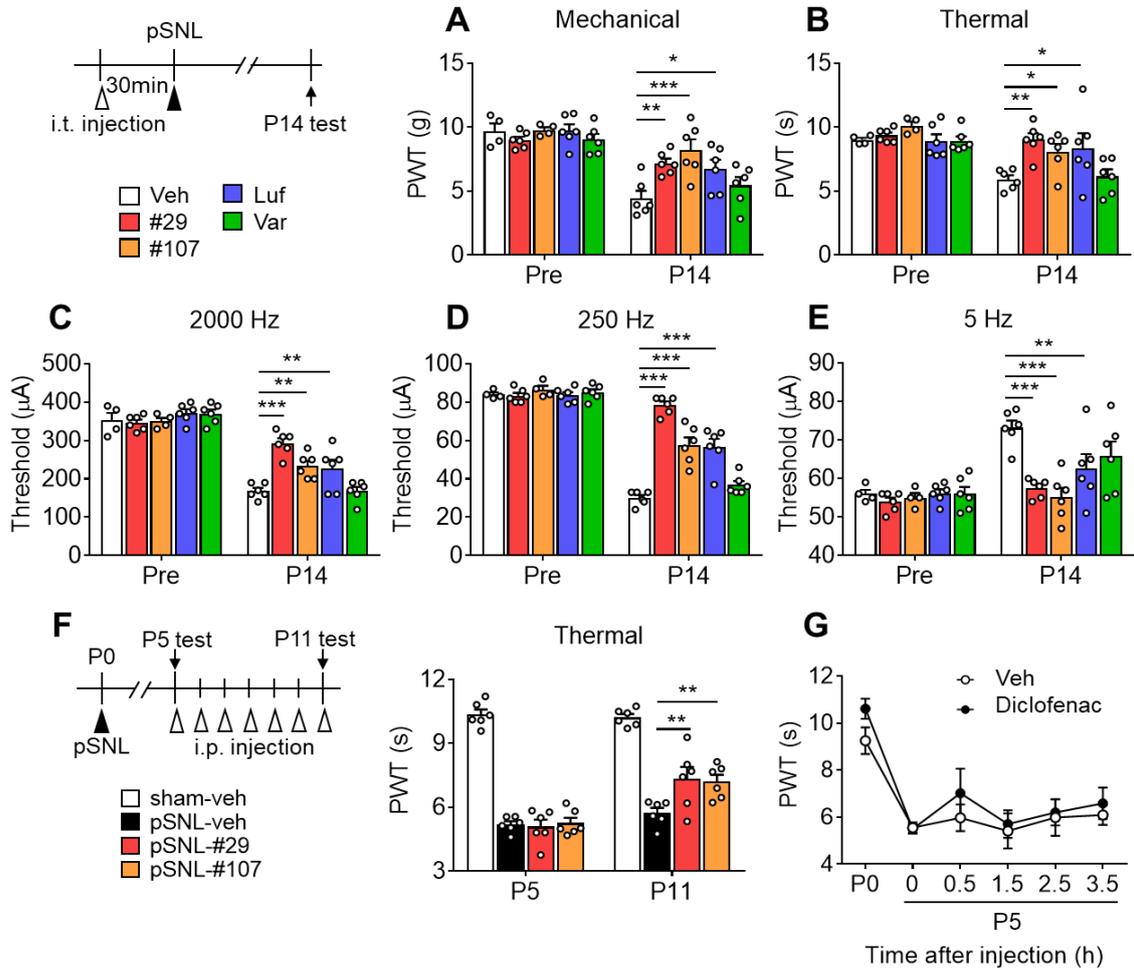


図 1-4 sPLA₂-III 阻害薬は神経傷害による疼痛反応を抑制した

(A-E) #29, #107, Luffarielollide および Varespladib の pSNL 30 分前髄腔内投与 (10 nmol/5 μ L) による機械性疼痛 (A)、熱性疼痛 (B)、EPW テストの 2000 Hz (C)、250 Hz (D)、5 Hz (E) の疼痛反応に対する影響。n = 4-6, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs Veh. (F) #29 および #107 の連続腹腔内投与 (10 mg/kg, P5-P11) の熱性疼痛反応への影響。n = 6, ** P < 0.01 vs P11 pSNL-veh. (G) ジクロフェナク投与による熱性疼痛反応への影響。n = 6. Veh : Vehicle, Luf : Luffarielollide, Var : Varespladib.

考察

LPA の前駆体である LPC の脳脊髄液中の濃度は血漿と比較して非常に低いため[34]、PLA₂の活性化は LPA を介した神経障害性疼痛のメカニズムと密接に関連すると考えられる。これまで私の研究チームは pSNL 処置により神経が傷害されると、SP/NK1 と Glu/NMDA 受容体システムを介した痛みの伝達による一次感覚線維と脊髄後角ニューロンの活性化が生じ、脊髄後角ニューロンの cPLA₂と iPLA₂の活性化が起きていたことを報告した [12,35]。cPLA₂と iPLA₂は pSNL1 時間後に活性が最高となっていたが、6 時間後には活性は元の状態に戻っていた[13]。しかし、LPA 産生は pSNL 後 2 週間以上続くため、cPLA₂や iPLA₂に引き続き、sPLA₂などの追加の PLA₂種も LPA 産生や神経障害性疼痛のメカニズムに関与していると推測した。

sPLA₂ は一般に約 14-18 kDa の低分子量の分泌酵素で、分子内ジスルフィドに富み、His-Asp 触媒モチーフと Ca²⁺結合部位が高度に保存されており、Ca²⁺依存性脂肪分解酵素のファミリーで構成される。これまでに哺乳動物では 10 種類の活性型分子種 (IB, II A, II C, II D, II E, II F, III, V, X, XIIA) が同定されており、それぞれの酵素が異なる組織、細胞に発現分布を示すことに加え[36]、いくつかの sPLA₂がホスファチジルコリンを触媒することが報告されている[37-43]。

本研究では、ナイーブマウスの脊髄後角における遺伝子発現の順位は cPLA₂α > iPLA₂β > sPLA₂-V > sPLA₂-III > sPLA₂-II F > sPLA₂-II D > sPLA₂-IB > sPLA₂-II C であることが明らかとなり、sPLA₂-II A, II E, X は検出されなかった。それらの中で、sPLA₂-III 遺伝子発現のみが pSNL に続いて遺伝子発現が増加した。sPLA₂-III の遺伝子発現増加は神経傷害後 6 時間から増加し、24 時間まで続くため、sPLA₂-III は LPA 産生および神経障害性疼痛のメカニズムに関与する候補として考えられた。

神経障害性疼痛における sPLA₂-III の役割を調査するために、この酵素を標的とする AAV-EmGFP-sPLA₂-III miRNA を設計し、pSNL の 4 週間前に miRNA を脊髄後角実質に直接投与すると、脊髄 sPLA₂-III の発現が減少し、機械性、熱性、EPW テスト (2000 および 250 Hz) で P14 の痛覚過敏が抑制された (図 1-2C-F)。また、興味深いことに、AAV の投与により pSNL によって誘発された痛覚鈍麻を改善するという結果が得られた。これらは 5 Hz での EPW テスト (図 1-2G) は、LPA_{1/3}拮抗薬である Ki16425 を使用した以前の研究と一致しており、sPLA₂-III により産生された LPA が関与している可能性が推測された[44]。また、痛みの慢性期における sPLA₂-III に対する AS-ODN の脊髄腔内への連投や siRNA の単回投与では、疼痛抑制効果がみられたことから sPLA₂-III が神経障害性疼痛の治療標的候補となる可能性が考えられた。

sPLA₂-III に対する阻害薬を探索するために、sPLA₂-III の基質である Bis-BODIPYTMFL C11-PC から生成された蛍光シグナルを測定することにより、化学ライブラリーからスクリーニングを行った。原理として、PLA₂が Bis-BODIPYTMFL C11-PC の sn-2 位置に存在

する脂肪酸を切断することによって、基質の蛍光消光が生じなくなり蛍光を発することを利用している。スクリーニングによって選択した 2401 化合物から IC₅₀ 値が 1 μM 未満の 2 つのヒット化合物#29 と#107 を候補化合物とし、新たに得られた候補化合物を再解析したところ、sPLA₂-III に対する阻害効力は、#29 (IC₅₀: 3.1 μM) で最も強力であり、次に Luffarielollide (IC₅₀: 10.7 μM) および#107 (IC₅₀: 13.6 μM) となり、Varespladib には阻害効果はみられなかった。その他の酵素群に対して、#29 は sPLA₂-IIA (IC₅₀: 3.8 μM) および iPLA₂β (IC₅₀: 21.2 μM) を阻害する効果がみられ、#107 は 4.4~42.2 μM の範囲で検討したすべての PLA₂ を阻害した一方で、#29 および#107 はともに PLA₁ は阻害しなかった。興味深いことに、Luffarielollide は iPLA₂β に対し阻害効果はなく、sPLA₂-V に対する阻害効果は非常に弱く示した。

sPLA₂-III に対し阻害効果をもつ#29、#107 および Luffarielollide と阻害効果を持たない Varespladib を pSNL の 30 分前に髄腔内投与し、疼痛に対する影響を検討したところ、#29、#107 および Luffarielollide では機械性、熱性疼痛試験、および EPW テスト (2000 および 250 Hz) において、P14 で疼痛反応を抑制し、5 Hz の刺激を使用した EPW テストの痛覚鈍麻も、これら 3 つの化合物によって顕著に抑制された。#29 は cPLA₂α に対する阻害作用はなく、Luffarielollide は cPLA₂α と iPLA₂β に対する阻害作用を有さない。このことから#29、#107 および Luffarielollide の疼痛抑制効果は、cPLA₂α または iPLA₂β の阻害に起因しないと考えられる。さらに、sPLA₂-IIA および sPLA₂-V に対し強力な阻害を示す Varespladib による痛覚過敏または痛覚鈍麻の抑制効果はないことから、どちらの酵素も神経障害性疼痛のメカニズムに関与していないことを示唆している。これらを考慮すると、pSNL 誘発性の痛覚過敏および痛覚鈍麻に対する#29、#107 および Luffarielollide の疼痛抑制効果は sPLA₂-III に関連していると考えられた。また、痛みが完全に確立されたのち、#29 および#107 の反復腹腔内投与においても治療効果が得られたことは、AS-ODN の髄腔内への連投や siRNA の単回投与における疼痛抑制効果と一致していることから sPLA₂-III が神経障害性疼痛の維持に関与している可能性が考えられた。

重要な点として、sPLA₂-III はリン脂質に対して作用し、痛みに関与するプロスタノイド産生に関与するアラキドン酸などの別の代謝物も生じる可能性があるということである [12,31]。そこで阻害薬における効果が LPC または LPA 産生の阻害に関連するかどうか検討するためにジクロフェナクによる検討を行った。以前の報告では、ジクロフェナク 10 mg/kg の i.p 投与で、関節炎アジュバントモデルに対し 1.5 時間で疼痛抑制を示したが [8]、pSNL 後の P5 では熱痛覚過敏を抑制しなかった (図 1-4G)。これらの結果は NSAIDs が一般に臨床モデルまたは動物モデルで神経障害性疼痛に対して効果が低いことと一致していることから、アラキドン酸経路の抑制が疼痛抑制効果を引き起こしているとは考えにくい [1,45]。一方で、miRNA、AS-ODN、siRNA、および阻害薬による sPLA₂-III 阻害が、脊髄後角での pSNL 誘導 LPA 産生の抑制を引き起こしているのかは検討できていないため、LC-MS [11] または MS-Imaging による LPA 産生の解析が課題である。

結論として、私は pSNL が脊髄後角における sPLA₂-III 遺伝子発現の増加を誘導することに加え、miRNA、AS-ODN、siRNA、またはいくつかの阻害薬を使用することにより、sPLA₂-III が神経傷害による痛覚過敏および痛覚鈍麻に関与することを明らかにした。さらに、これらの阻害薬を繰り返し投与により、確立された痛みに対する治療作用も得ることができたことから、sPLA₂-III は神経障害性疼痛の新たな治療標的である可能性を示した。今後の展望として、より特異的な sPLA₂-III 阻害薬を得るための最適化研究と、sPLA₂-III 阻害による LPA 産生の抑制検証が次の課題である。

第二章

FM モデルにおける LPA 合成酵素の関与の解明

難治性慢性疼痛の代表的な疾患の 1 つとして線維筋痛症 (fibromyalgia : FM) が挙げられる。FM とは先進国在住者の 2-4% が発症し慢性的かつ広範囲な痛みが生じる疾患であり、定義された身体部位に圧痛を認める以外、一般臨床初見に異常は見られない。治療においては抗うつ薬、抗痙攣薬が主であり、NSAIDs や副腎皮質ステロイド薬は一般的には無効であるとされる。その中で、プレガバリンが欧米を含め第一選択薬に挙げられているが、有害事象としてめまいや眠気、浮腫、体重増加などが存在し、使用できない場合もある。オピオイド薬においては鎮痛効果が乏しいことに加え、強オピオイドである麻薬性鎮痛薬は依存性や社会的問題から原則的に FM の疼痛緩和目的では使用は推奨されていない。そのため、FM の疾患メカニズムの解明および新規治療薬の開発が強く望まれている。

長崎大学の植田らはこれまで FM モデルとして intermittent psychological stress (IPS) モデルを提唱した [10]。このモデルでは断続的心理的ストレスを負荷が持続的な全身性慢性疼痛を誘発することが示されている。治療薬理学的研究ではプレガバリンや種々の抗うつ薬により有効性が確認されているが、抗炎症薬やモルヒネに対しては抵抗性を示すことを明らかにした [10]。注目すべき点として、この IPS モデルのほか、酸性食塩水の筋肉注射によるモデル [46] や断続的冷温ストレス負荷モデル [47] といった別の FM モデルによる慢性の全身性疼痛は LPAR₁ 遺伝子欠損 (LPAR₁-KO) マウスで消失することが報告されていることである [8]。しかし、脳内の LPA 産生が FM メカニズムに関与するかどうかは不明であった。本研究では、神経障害性疼痛モデルにおける脊髄の sPLA₂-III の役割の類推として、FM モデルにおける脳内の sPLA₂-III の関与について検討した。

実験方法

実験動物および実験環境

第一章の実験方法と同じ。sPLA₂-III 遺伝子欠損 (sPLA₂-III-KO) マウスは東京大学の村上誠教授から譲渡していただいた。

断続的精神的ストレスモデル (Intermittent psychological stress model : IPS model)

マウスは 9 区画 (10 cm × 10 cm) を透明なプラスチック板で区切られたコミュニケーションボックス (CBX-9M, Muromachi-Kikai) に入れ、フットショックマウスと精神的ストレス負荷を 5 日間連続で行った。フットショックマウスはグリッド床上で既報のように shock generator (CSG-001, Muromachi-Kikai) と cycler timer (CBX-CT, Muromachi-Kikai) を用い [48,49]、0.6 mA, 1 秒間、平均 47 秒のランダムな間隔で 120 回フットショッ

クを与えた。IPS マウスは絶縁体が足元に敷かれ、フットショック群を見たり、聞いたりすることで精神的ストレスを与えた。

組織回収およびリアルタイム PCR

マウスを第一章で使用した 3 種混合麻酔薬を投与し、麻酔下にて全脳を摘出し、氷冷した PBS に浸した。その後、ブレインスライサーとカミソリにて吻側より 1 mm 厚の切片を作製し、PVN を含む視床下部領域をカミソリで切り取り、液体窒素により凍結させた後、-80°C で保存した。

RNA 抽出およびリアルタイム PCR の方法は第一章の実験方法と同じ。使用したプライマーは Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入し、以下の表に記載した。

	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
cPLA ₂ α	GTGAGGGGCTTTATTCCACA	ACACCAGAGAATCCCACCAT
iPLA ₂ β	GTCACCTGGACCCTGCTTAG	TCCGAAGAAGTGCATCCTCT
sPLA ₂ -III	TCCTCCAGACCTGATATGATCC	ACAGACTCGGTGGGCACT
sPLA ₂ -V	CTATGGCTTCTACGGCTGCT	AACAACGGTCGTGCATCTG
CD11b	TGTCCCTGGCTGTTTCTACTG	ATTCTCCTTGCAGTTTTGGTG
GAPDH	TGTCCGTCGTGGATCTGAC	CCTGCTTCACCACCTTCTTG

疼痛評価

第一章の実験方法と同じ。

阻害薬投与

LPAR_{1/3} 拮抗薬である Ki16425 はキリンビール株式会社から提供していただき、10% DMSO を含む aCSF を調製し、10 nmol/ 5 μL となるよう i.t. および i.c.v. 投与をストレス負荷 1 日後から 7 日間、連日投与した。sPLA₂-III 阻害作用を有する #29、PLA₂ 阻害剤として知られている Luffarielollide および Varespladib は第一章と同じものを使用し、5% DMSO を含む aCSF を調製し、10 nmol/ 5 μL となるよう i.c.v. 投与をストレス負荷 1 日後から 7 日間、連日投与した。

PLX3397 によるミクログリア除去

ミクログリア除去のために、Research Diets から購入した PLX3397 含有 (290 mg/kg) 飼料を 21 日間摂食させた。コントロールマウスは通常の飼料を与えた。PLX3397 前処置で

はストレス負荷 3 週間前から摂食させることで、ミクログリアを枯渇させた。後処置では、ストレス負荷後 5 日目から 2 週間摂食させた。退薬に関しては、1 週間通常の飼料に戻すことでミクログリアの回復を行った。

免疫染色

マウスを麻酔下にて開胸し、0.1 M PBS (pH7.4) を 10 ml 経心灌流することで脱血した後、4% PFA in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) 10 ml で経心灌流し、全身を固定した。その後全脳を摘出し、4% PFA 溶液で 4°C にて 3 時間、後固定を行った。次に 4°C にて 15% sucrose in 0.1 M phosphate buffer に一晩静置し、粉碎したドライアイス (中川産業) にて脳組織を凍結し、-80°C にて保存した。次に、マイクローム刃 (LEICA819; Leica, Germany) を装着した凍結マイクローム (LEICA3000; Leica, Germany) を用いて厚さ 20 μm の凍結切片を作製し、MAS コート付スライドガラス (松浪硝子工業) に接着した。切片作製の前に組織サンプルはマイクローム内で 30 分以上静置し、マイクローム内の温度 (-17 から -20°C) まで組織サンプルの温度が上昇してから切片作製を開始した。

脳切片を 0.1% Triton-X100 を含む PBS にて透過処理を施した後、0.3% BSA を含む PBS (抗体希釈液) にてブロッキングした。一次抗体として rabbit polyclonal anti-Iba1 antibody (1:500; WAKO) を用いて 4°C で一晩静置し、PBS による洗浄後、適切な蛍光標識二次抗体 (1:300; Molecular Probes, Oregon, USA) と室温遮光条件で 1 時間反応させた。PBS による洗浄後、Fluoromount/Plus (Diagnostic Biosystems, Pleasanton, CA, USA) によりスライドガラス上に封入した。乾燥後、共焦点顕微鏡 (Fluoview FV10i; オリンパス) により画像を取得した。

脾臓細胞調製および移植

脾臓は control マウスおよび IPS マウスから取り出した。摘出した脾臓は氷冷した 2% fetal bovine serum (FBS) (Gibco Grand Island, NY, United States) および penicillin/streptomycin 含有の RPMI 1640 培地 (Gibco) 中で保存した。脾臓を 1 mL シリンジの底面を使い、5 mL の培地中ですりつぶした。70 μm Cell strainer (Corning, Glendale, AZ, USA) を 50 mL チューブに取り付け、すりつぶした脾臓をフィルターに通した。500 g、5 min、4°C の条件で遠心分離を行い、上清を取り除き、3 mL red blood cell lysis buffer (Abcam, San Diego, CA, USA) を加え、ペレットをほぐした。3 分間放置した後、氷上で冷却した 5 mL の PBS (Na_2HPO_4 9.235 mM, NaH_2PO_4 1.875 mM, NaCl 0.145 M) (2% FBS) を加え、500 g、10 min、4°C の条件で遠心分離を行った。上清を取り除き、5 mL の冷却 2% FBS 含有 PBS を加え、500 g、5 min、4°C の条件で遠心分離を行った。3 mL の冷却 2% FBS 含有 PBS 中でペレットをほぐし、70 μm Cell strainer を通過させ、氷冷した 2% FBS 含有 PBS を加えて 1×10^6 cells/150 μL となるように調製した。脾臓細胞移植を行うナイーブマウスには、細胞懸濁液を 1 匹あたり 1×10^6 cells/150 μL ずつ静脈内投与し

た。

統計評価

第一章の実験方法と同じ。

実験結果

第一節 IPS モデルにおける脳内 LPA の関与

これまで IPS モデルを用いた植田らの報告[10]では、 $LPAR_1$ -KO マウスにおける全身性疼痛の消失が示されてきたが、これ以外にも $LPAR_3$ -KO マウスでも同様な疼痛遮断効果が確認されている。一方、 $LPAR_1$ 拮抗薬である AM966 をモデル作製後に脳室内に連続投与した実験では IPS 誘発性の熱性疼痛反応を抑制したが、脊髄腔内投与では無効であった。そのことから IPS モデルにおける疼痛は脳内の LPA が関与していると推測された[10]。LPA 生合成の研究の前段階として、 $LPAR_{1/3}$ の関与を自ら確認するために、別の $LPAR_{1/3}$ 拮抗薬である Ki16425 をストレス負荷 1 日後から 7 日間 (P1-P7)、毎日脳室内連続投与を行ったところ、ストレス負荷 8 日後 (P8) の機械性疼痛反応および EPW テストにおいては Vehicle 群 (Veh) における 2000 Hz および 250 Hz の疼痛閾値低下が消失することが確認できた (図 2-1A-C)。また、脊髄腔内投与によってはこのような遮断効果は観察されなかった (図 2-1D-F)。このことから、LPA は IPS モデルにおける脳内で関与し、疼痛に寄与している可能性が考えられた。

第二節 IPS モデルにおける視床下部の PLA_2 遺伝子発現変化

筋痛性脳脊髄炎/慢性疲労症候群や FM、PTSD のようなストレスに関与する疾患は視床下部-下垂体-副腎系である HPA axis に異常があることが知られており [50-52]、臨床における線維筋痛症においても視床下部の神経炎症の関与が報告されている [53]。脳内 LPA 合成酵素の関与を検討するために IPS モデル視床下部における各種 PLA_2 の遺伝子発現変化をリアルタイム PCR により検討を行った。特に PC に対し親和性が強いとされる $sPLA_2$ 群の $sPLA_2$ -III, V, X の解析を行ったところ $sPLA_2$ -III がストレス負荷 4 日目 (D4) から顕著に増加し、ストレス負荷 1 日後 (P1) まで持続していた (図 2-2A)。その後ストレス負荷 7 日後 (P7) には元の発現量に戻っていた。一方 $sPLA_2$ -V の増加はみられず、 $sPLA_2$ -X は発現が測定限界以下であった。 $cPLA_2$ 、 $iPLA_2$ 群においても増加はみられなかった (図 2-2B-D)。

第三節 $sPLA_2$ -III ノックアウトマウスによる効果

$sPLA_2$ -III が関与する可能性から、 $sPLA_2$ -III-KO マウスを使用し、IPS モデルを作成した。その結果、ストレス負荷 5 日後 (P5) において WT マウスでは機械性および EPW テストの疼痛反応は抑制された (図 2-3A-C)。このことから、 $sPLA_2$ -III は IPS モデルにおける疼痛に関与することが示唆された。

第四節 $sPLA_2$ -III 阻害薬の脳室内投与による効果

第一章では $sPLA_2$ -III 阻害薬としての #29 と Luffarielollide の神経障害性疼痛モデルにおける抑制効果について述べてきた。本章では IPS モデルにおいてこれらの阻害剤の効果を

検証することとした。この二剤について脳室内にストレス負荷 1 日後から 7 日間 (P1-P7) 連続で投与し疼痛評価を行ったところ、機械性および EPW テストの 2000 Hz と 250 Hz で疼痛評価では vehicle 群において観察された疼痛反応は #29 および Luffarielollide により有意に抑制された。一方、sPLA₂-III に阻害効果がなくその他の sPLA₂ 群に対し阻害効果を持つ Varespladib の投与では疼痛反応の抑制は観察されなかった (図 2-4A-C)。#29 は cPLA₂ α に対する阻害作用はなく、Luffarielollide は cPLA₂ α と iPLA₂ β に対する阻害作用を有さない。このことから #29、Luffarielollide の疼痛抑制効果は、cPLA₂ α または iPLA₂ β の阻害に起因しないと考えられる。さらに、sPLA₂-IIA および sPLA₂-V に対し強力な阻害を示す Varespladib では影響が見られなかったことから、sPLA₂-IIA および sPLA₂-V の阻害によるものではないと考えられる。このことからこれら阻害薬による疼痛抑制効果は sPLA₂-III の阻害によるものだと考えられる。

第五節 IPS モデルにおけるミクログリアの関与と疼痛との関与

FM において脳内のミクログリアの活性が活性化していることが報告されていることや [54]、動物を使用した FM モデルにおいてミクログリアの関与が示唆されている [55,56]。さらに神経障害性疼痛において脊髄内に LPA が産生されるとミクログリアが活性化し、さらなる LPA 産生につながることを示唆されてきた。そこで、脳内においても同様の機構が働きミクログリアが LPA 産生に寄与しているのではないかと推測した。sPLA₂-III の発現変化が起きていた視床下部において同様のタイムコースでミクログリアのマーカーである CD11b の発現をリアルタイム PCR により検討したところ、ストレス負荷 4 日目 (D4) で遺伝子発現増加がみられた (図 2-5A)。sPLA₂-III の遺伝子発現増加が D4 から P1 にかけて増加していたことを考えると、ミクログリアの活性化は sPLA₂-III の遺伝子発現増加の前に起きていると考えられた。

そこで、ミクログリアの活性化により sPLA₂-III の遺伝子発現が増加しているのではないかと考え、CSF1R 阻害薬であり、その連続投与により脳内においてミクログリアを枯渇させることができる PLX3397 [57] を食餌より経口摂取させ、ミクログリアの除去を試みた。ミクログリアの除去はミクログリアのマーカーである Iba1 の免疫染色で確認した (図 2-6B)。また、PLX3397 を 3 週間摂取後における CD11b の遺伝子発現を定量したところ、発現量は 2% 程度まで低下していた (図 2-5C)。次に、PLX3397 を摂取したマウスにおいて、sPLA₂-III の遺伝子発現を解析したところ対照群ではストレス負荷により sPLA₂-III の発現が増加していたが、PLX3397 群ではストレス負荷における sPLA₂-III の遺伝子発現が増加しないという結果が得られた (図 2-5D)。このことから、sPLA₂-III の発現にはミクログリアの活性化が関与している可能性が考えられる。

脳内のミクログリアの活性化が疼痛に及ぼす影響を検討するために、あらかじめ PLX3397 を 3 週間経口投与しておき、ストレス負荷後に疼痛評価を行った。機械性および EPW テストの 2000 Hz、250 Hz における疼痛評価を行ったところ、対照群ではストレス負

荷により疼痛反応が生じた一方で、PLX3397 投与群ではそれぞれの疼痛反応が抑制された (図 2-5E-G)。CD11b の遺伝子発現の増加が D4 で増加していたことから、ミクログリアは疼痛形成期に関与する可能性が考えられた。そこで P5 において疼痛が形成されたことを確認後、PLX3397 を 2 週間経口摂取させ、疼痛への影響を検討した。その結果、対照群、PLX3397 摂取群のどちらにおいても P19 で機械性および EPW テストの 2000 Hz、250 Hz による刺激によって疼痛反応が惹起されており、対照群と PLX3397 摂取群で差は見られなかった (図 2-5H-J)。このことからミクログリアは疼痛形成の初期に関与する可能性が示された。

また、PLX3397 前投与で疼痛反応が抑制された後、PLX3397 を退薬させると疼痛反応が再び生じる可能性についても検討を行った。PLX3397 の退薬後 7 日目においてミクログリアは約 100%まで回復することが報告されている [57]。そこで、PLX3397 を P5 で退薬後 P12 における疼痛反応を検討したところ、退薬により疼痛が誘発されることはなかった (図 2-5K-M)。このことからミクログリアはストレス負荷により初期に活性化することで疼痛を惹起し、維持には関与しない可能性が示された。

第六節 IPS モデルにおけるミクログリアと脾臓細胞誘発性疼痛との関与

酸性食塩水投与モデルにおいて痛覚過敏が生じたマウスの脾臓細胞をナイーブマウスに移植するとドナーマウスと同様に痛覚過敏が引き起こされることが報告された。さらにその脾臓細胞誘発性疼痛はミノサイクリンによりミクログリアの活性化を抑制することで、抑制され、ミクログリア-末梢免疫との関与が示唆された [56]。特に FM において血中のサイトカイン値の上昇など末梢免疫系の異常は示唆されていること [58,59] から、ストレスによる中枢神経系の異常な活性化は免疫の異常を引き起こす可能性が考えられる。そこで、IPS モデルにおいても同様に脾臓細胞誘発性疼痛が引き起こされるのか検討するために、対照群およびストレス負荷 5 日後における脾臓を回収し、脾臓細胞に分離した後、ナイーブマウスに $1 \times 10^6 / 150 \mu\text{L}$ で i.v. 投与を行った。細胞を投与後 1 日目に疼痛評価を行ったところ、対照群の脾臓細胞は機械性および EPW テストの 2000 Hz、250 Hz の疼痛反応を誘発しなかった一方で、IPS マウスの脾臓は疼痛反応を引き起こした。次に酸性食塩水投与モデルで報告されているようにミクログリアとの関与を検討するために PLX3397 の前処置によって疼痛が抑制されたマウスの脾臓をナイーブマウスに移植したところ、疼痛反応は誘発されなかった (図 2-6A-C)。このことから IPS モデルにおいてもミクログリアの活性化は脾臓細胞誘発性疼痛に関与している可能性が示された。

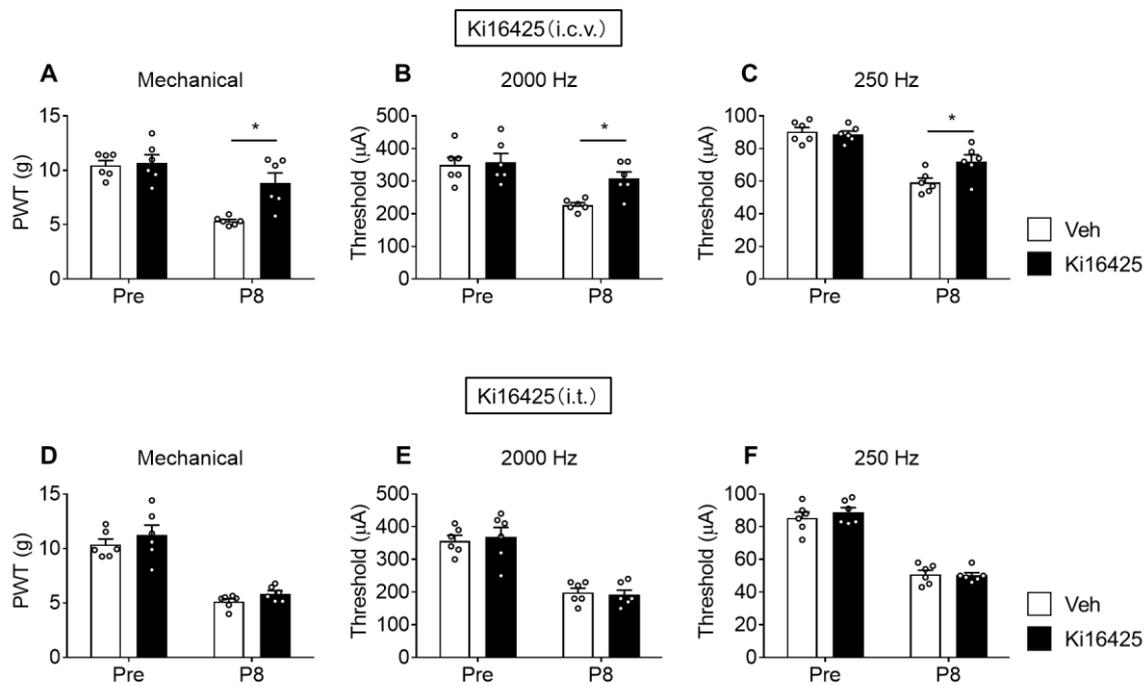


図 2-1 LPA 受容体阻害剤の脳室内投与では疼痛反応を抑制したが、髄腔内投与では疼痛反応を抑制しなかった

(A-C) Ki16425 を P1-7 において連続脳室内 (i.c.v.) 投与を行い、P8 で機械性疼痛反応 (A)、EPW テストの 2000 Hz (B)、250 Hz (C) の疼痛反応をそれぞれ評価した。(D-F) Ki16425 を P1-7 において連続髄腔内 (i.t.) 投与を行い、P8 で機械性疼痛反応 (D)、EPW テストの 2000 Hz (E)、250 Hz (F) の疼痛反応をそれぞれ評価した。n = 6, * $P < 0.05$ vs P8 Veh. Veh : Vehicle.

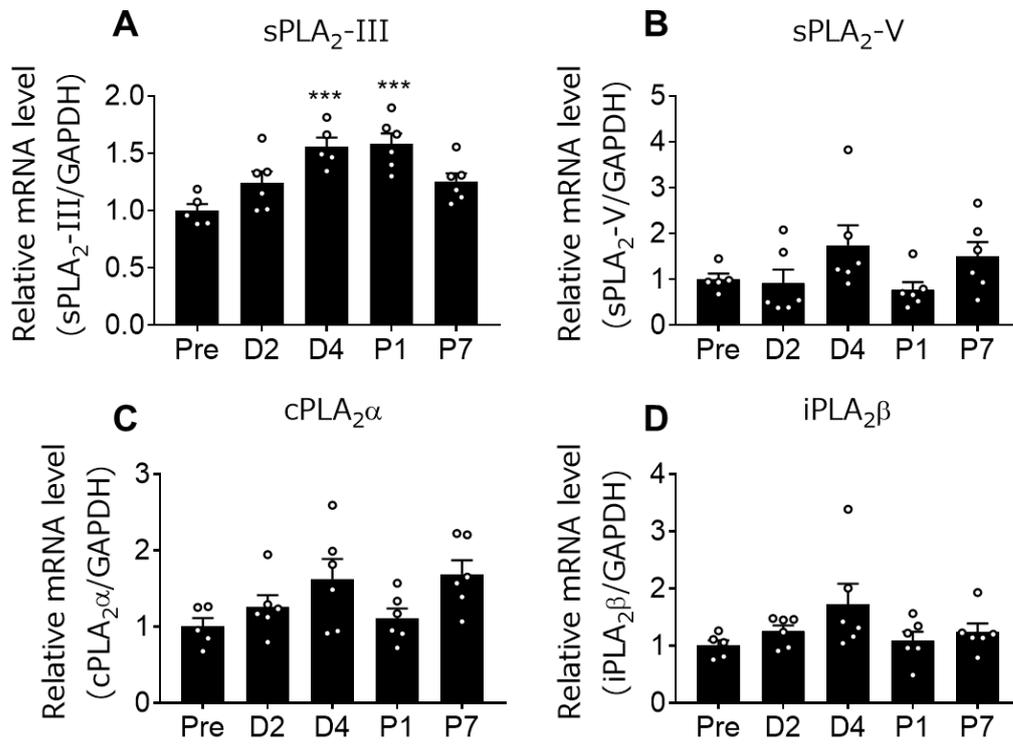


図 2-2 IPS モデルにおける視床下部において sPLA₂-III の遺伝子発現が増加した
 (A-D) 各種 PLA₂ の視床下部における遺伝子発現変化のタイムコース。n = 5-6, *** $P < 0.001$ vs Pre.

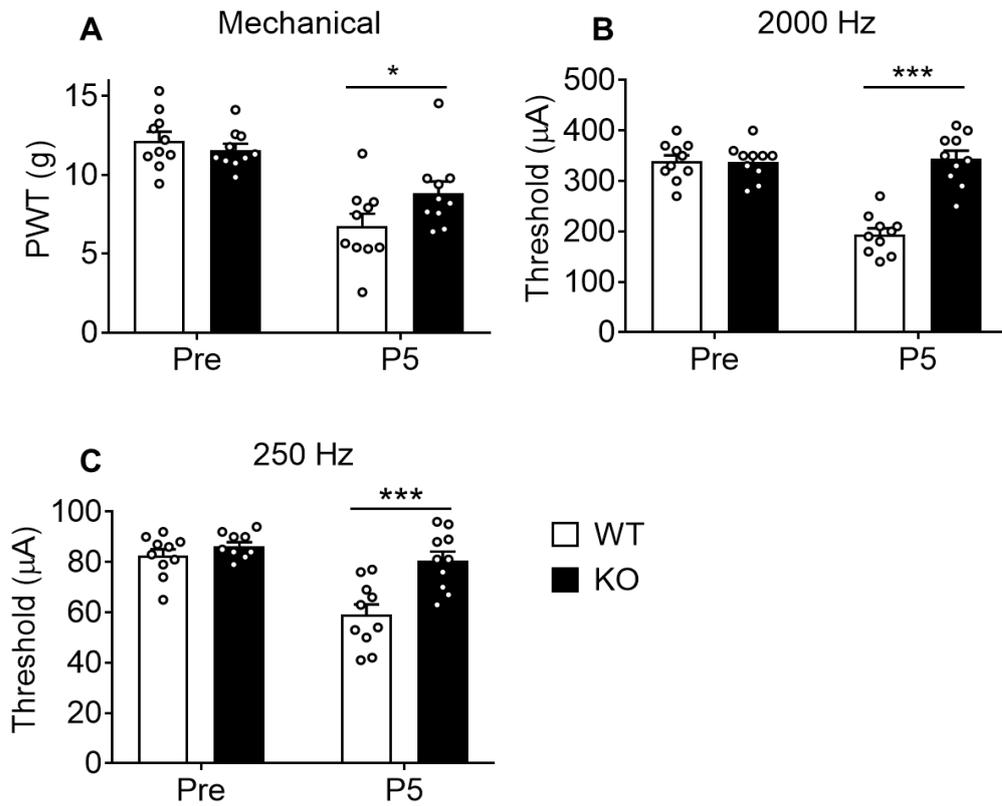


図 2-3 sPLA₂-III-KO マウスは IPS モデルにおける疼痛反応を抑制した

(A-C) WT および sPLA₂-III-KO マウスで IPS モデルを作製し、P5 で機械性 (A)、EPW テストの 2000 Hz (B)、250 Hz (C) の疼痛反応をそれぞれ評価した。n = 10, **P* < 0.05, ****P* < 0.001 vs P5 WT.

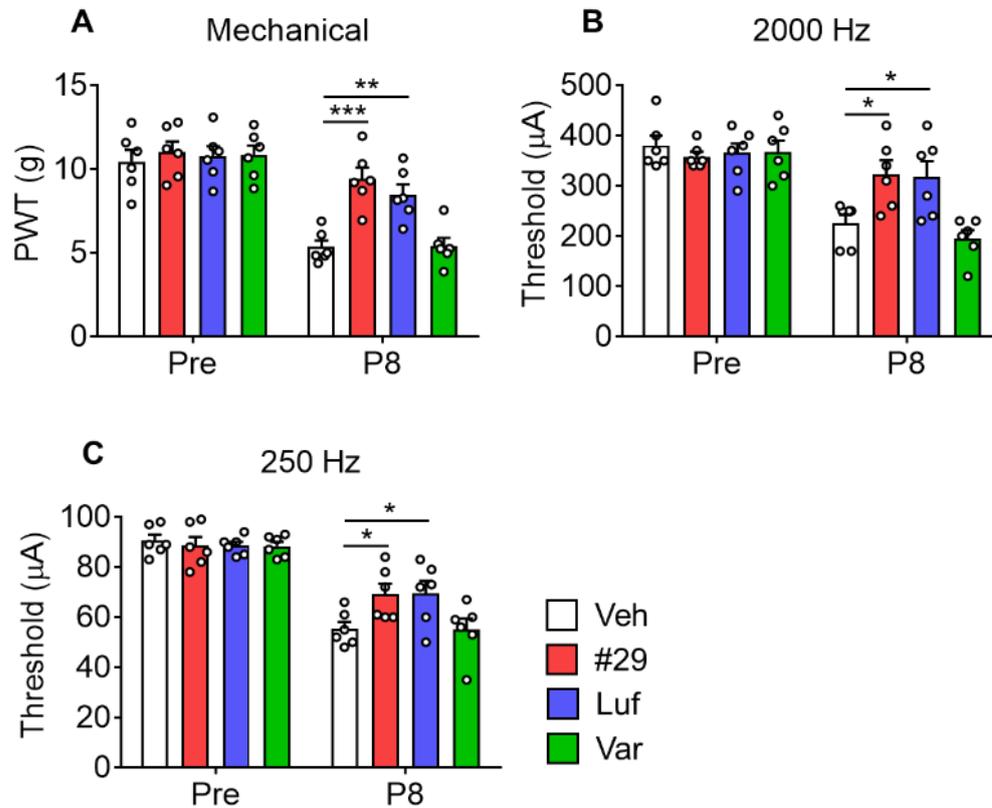


図 2-4 sPLA₂-III阻害薬の連続脳室内投与は疼痛反応を抑制した

(A-C) 各 sPLA₂-III阻害薬を P1-7 において脳室内投与を行い、P8 で機械性疼痛反応 (A)、EPW テストの 2000 Hz (B)、250 Hz (C) の疼痛反応をそれぞれ評価した。n = 6, *P < 0.05, ***P < 0.001 vs P8 Veh. Veh : Vehicle、Luf : Luffarielollide、Var : Varespladib.

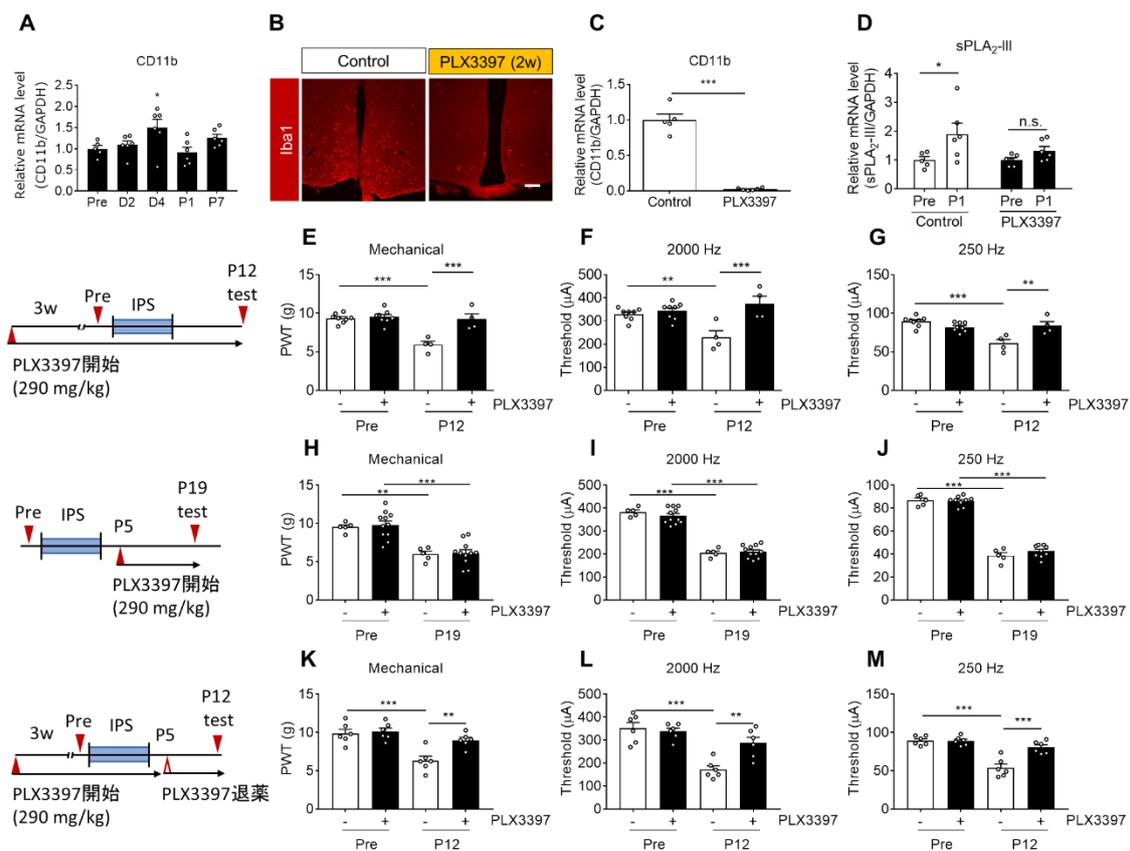


図 2-5 IPS モデルにおいてミクログリアが関与し、PLX3397 前処置は疼痛反応を抑制した

(A) IPS モデルにおける CD11b の発現変化のタイムコース。n = 6, * $P < 0.05$, vs Pre. (B) PLX3397 の 2 週間処置による Iba1 の免疫染色画像。スケールバー: 100 μm 。(C) PLX3397 の 3 週間処置による CD11b の遺伝子発現の変化。n = 5-6, *** $P < 0.001$ vs Control. (D) PLX3397 の 3 週間処置後、ストレス負荷後 1 日目における sPLA₂-III の遺伝子発現の変化への影響。n = 5-6, * $P < 0.05$, vs Control- Pre. (E-G) PLX3397 を 3 週間経口摂取した後、IPS モデルにおける P12 での機械性疼痛反応 (E)、EPW テストの 2000 Hz (F)、250 Hz (G) の疼痛反応をそれぞれ評価した。n = 4-8, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Pre (-), vs P12 (-). (H-J) IPS モデルを作成したのち PLX3397 を 2 週間経口摂取した後、P19 での機械性疼痛反応 (H)、EPW テストの 2000 Hz (I)、250 Hz (J) の疼痛反応をそれぞれ評価した。n = 5-11, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Pre (-), vs P19 (-). (K-M) PLX3397 を 3 週間経口摂取した後、IPS モデルを作成し、P5 から PLX3397 を退薬させ、ミクログリアを回復させた。図は退薬後 P12 での機械性疼痛反応 (K)、EPW テストの 2000 Hz (L)、250 Hz (M) の疼痛反応をそれぞれ評価した。n = 6, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Pre (-), vs P12 (-).

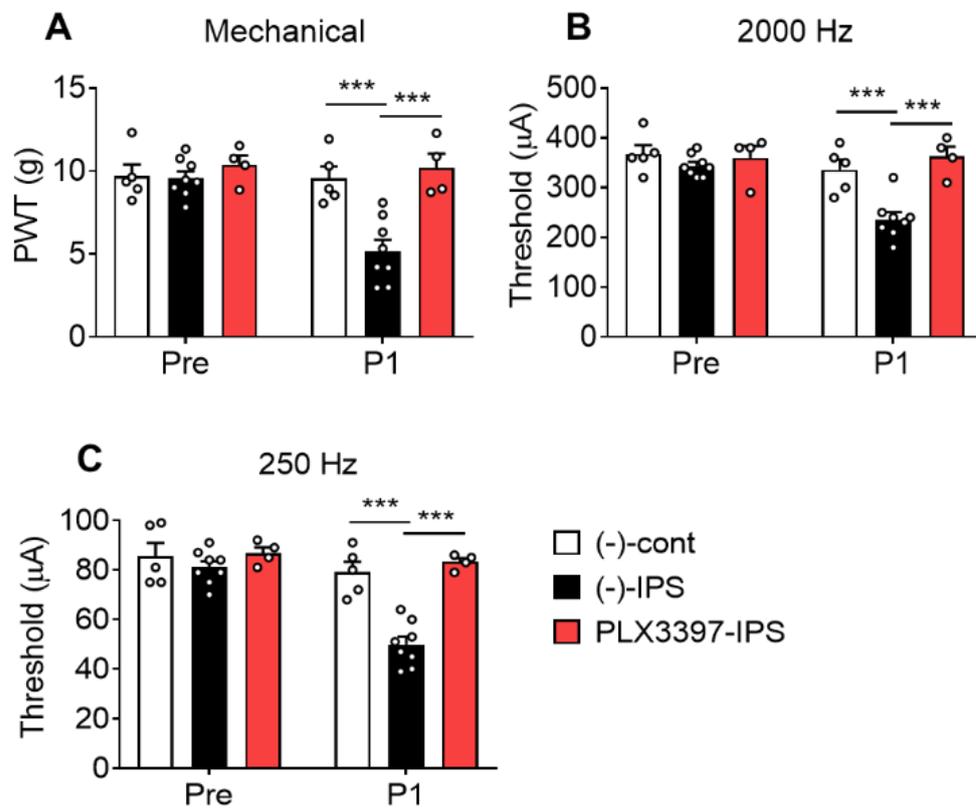


図 2-6 ミクログリアの除去は脾臓誘発性の疼痛反応を抑制した

(A-C) PLX3397 を 3 週間経口摂取させた後、IPS モデルを作成し P5 で脾臓細胞を回収した。脾臓細胞をナイーブマウスに $1 \times 10^6/150 \mu\text{L}$ で i.v.投与を行い翌日 (P1) で疼痛反応を評価した。機械性疼痛反応 (A)、EPW テストの 2000 Hz (B)、250 Hz (C)。n = 4-8, *** $P < 0.001$ vs P1 (-) -cont, vs P1 (-) -IPS.

考察

これまで FM と LPA に関しては酸性食塩水モデルおよび、断続的冷温ストレス負荷モデルおよび IPS モデルにおいても LPA の関与は報告してきた[10]。LPA 生合成に関与の研究の前段階として、LPAR_{1/3}の関与を自ら確認するために、別の LPAR_{1/3}拮抗薬である Ki16425 を P1-P7 の期間、毎日脳室内連続投与を行ったところ、投与翌日の P8 の機械性疼痛反応および EPW テストにおいては Vehicle 群(Veh)における 2000 Hz および 250 Hz の疼痛閾値低下が消失することが確認できた (図 2-1A-C)。さらに LPAR_{1/3} 拮抗薬である Ki16425 をストレス後 1 日目から 7 日目まで脳室内投与をすると疼痛反応が抑制され、髄腔内投与では疼痛反応が抑制されなかったことから、LPA は脳内で関与することが示唆された。慢性ストレス負荷時には脳において LPC が増加するなど、脂質の割合が変化することが知られており[60]、さらに LPA はストレスにおいて海馬で濃度の上昇がみられ、記憶や感情の調節に関与することが示唆されている[61]。また ATX は FM の CSF において増加していることから[62]、LPA はストレス時における重要な因子であると考えられる。一方で、CSF における LPC は検出限界下であるという報告もあり[21]、脳内の LPA 産生において PLA₂が律速段階を担うことが推測される。

FM において HPA axis の異常は報告されており[51]、IPS モデルにおける視床下部の LPA 合成酵素をリアルタイム PCR により解析を行ったところ、視床下部において sPLA₂-III が増加することが明らかとなった。

次に sPLA₂-III-KO マウスを用い IPS モデルにおける疼痛評価を行ったところ、機械性および電気刺激性疼痛反応を抑制した。第一章で得られた sPLA₂-III 阻害薬である #29、Luffarielollide および Varespladib をストレス負荷 1 日後から 7 日後まで毎日脳室内に連続投与を行ったところ、#29 と Luffarielollide で疼痛反応が抑制され、Varespladib では抑制されなかった。#29 および Luffarielollide で抑制されたことから cPLA₂、iPLA₂阻害による関与、Varespladib で抑制されなかったことから sPLA₂-V 阻害による疼痛抑制ではないと考えられる。今回脳室内投与により疼痛抑制効果がみられたことから、脳内の sPLA₂-III の関与が考えられるが脳領域の特定までは至れていない。視床下部における sPLA₂-III の発現増加がおきていたことから視床下部の sPLA₂-III の関与が考えられるが、その他の脳領域の sPLA₂-III の発現増加や、脳領域特異的なノックダウンによる疼痛反応への影響を検討する必要がある。

以前の報告で、酸性食塩水投与による FM モデルではミノサイクリンの投与によるミクログリアの活性化の阻害により、疼痛反応が抑制されることが示唆された[56]。また FM において脳内のミクログリアの活性が起きており、神経炎症を引き起こしている可能性が示されていること[54]や、動物を使用した FM モデルにおいてミクログリアの関与が示唆されている[55,56] ことが報告されている。さらに神経障害性疼痛において LPA がミクログリアを活性化することでさらなる LPA 産生につながるということが報告されていることから

[12]、同様に脳内における LPA-ミクログリア経路が関与する可能性が考えられた。そこで、IPS モデルにおけるミクログリアの活性化を検討するために、視床下部においてミクログリアのマーカーである CD11b の遺伝子発現の変化を解析したところ、ストレス負荷 4 日目において CD11b の遺伝子発現が増加していた。sPLA₂-III の発現がストレス負荷 4 日目からストレス負荷 1 日後まで増加しており、CD11b の発現上昇がストレス負荷 4 日目であったことから、sPLA₂-III の発現にミクログリアが関与している可能性が推測された。そこで、PLX3397 を経口摂取させることでミクログリアの除去を試みた。PLX3397 を 3 週間摂食させ、IPS モデルを作成したところ、対照群では sPLA₂-III の発現増加が見られた一方で、PLX3397 を摂食させた群では増加は見られなかった。また、ストレス負荷 1 日後における sPLA₂-III の発現は PLX3397 を摂取した群で減少傾向がみられた。以上の結果から、sPLA₂-III の発現増加にはミクログリアが関与している可能性が示された。sPLA₂-III の発現メカニズムで報告されていることとして、酸化ストレスによりアストロサイトで発現が増加すること [63] や SREBP1 が発現に関与していること [64] が示唆されている。ミクログリアの活性化に伴い ROS が産生されることが報告されていることから [65]、ミクログリアによる ROS 産生がアストロサイトを刺激し sPLA₂-III の発現を誘導している可能性が考えられる。また、SREBP1 は NMDA 受容体の刺激により誘導されることから [66] ミクログリア活性化による液性因子の放出により神経の NMDA 受容体が刺激された結果、sPLA₂-III の誘導が起きている可能性が考えられる。

次に IPS モデルにおけるミクログリアと疼痛との関与の検討を行った。まず PLX3397 を 3 週間摂取した群では対照群と比較し、疼痛が顕著に抑制された。CD11b の発現増加はストレス負荷後において見られなかったことから、ミクログリアは疼痛形成に関与し、疼痛維持には関与していないと考えられた。そこで、PLX3397 を疼痛形成後の P5 から 2 週間摂取させたところ、疼痛反応は抑制されなかった。さらに疼痛形成後のミクログリアが関与しないことを検討するため、PLX3397 を前処置し、疼痛が抑制されたのちに退薬をさせることでミクログリアを回復させ疼痛への影響を検討したところ、疼痛は抑制されたままだった。このことからミクログリアはストレス負荷時に活性化することで疼痛形成に関与し、疼痛形成後の痛みの維持には関与しないと考えられる。

また、近年酸性食塩水投与による FM モデルでは脳内のミクログリアの活性化を抑制することで脾臓の活性化を抑制することが明らかとなった [56]。そこで、IPS モデルにおいても PLX3397 処置により脾臓細胞誘発性の疼痛が抑制されるのか検討を行ったところ、対照群では顕著に疼痛反応が見られた一方で、PLX3397 摂取群では疼痛反応が誘発されなかった。このことから IPS モデルにおいてもミクログリアの活性化は脾臓細胞を活性化し、全身性の疼痛反応を引き起こしている可能性が考えられる。

脾臓は交感神経系および副腎髄質系によって制御されていることが知られており、近年、脳から脾臓へ投射する神経経路として、扁桃体中心核の CeA と視床下部の PVN の CRH 神経からノルアドレナリン作動性の脾臓神経を介した脾臓免疫細胞の直接的な活性化経路が

明らかになった[67]。また、繰り返し拘束ストレスは脾臓における免疫細胞の比率を変化させ、これらにはグルココルチコイド受容体や β -アドレナリン受容体の関与が重要であることが示されている [68]。免疫細胞においてもこれら受容体が発現しており、拘束ストレスによって T 細胞の割合が変化する報告もある[69]。また、FM 患者の IgG をマウスへ投与することにより疼痛反応が起きることが報告されていることから[70]、FM において全身の免疫応答の変化が病態に関与することも推測されている。今回明らかとなった視床下部におけるミクログリアの活性化は、視床下部の神経に影響を及ぼし、脾臓の活性化および全身性の免疫応答に影響を及ぼしている可能性が考えられる。今後として、脳内の LPA の増加を LC-MS または MS-Imaging により解析を行い、ミクログリアおよび末梢免疫との関連を明らかにすることが課題である。

以上のことをまとめると、精神的ストレスにより視床下部の sPLA₂-III の遺伝子発現が増加し、LPA を産生すると考えられる。LPA はミクログリアを活性化させ、sPLA₂-III の発現を誘導し、さらなる LPA の産生に関与する可能性が考えられる。また、これらは視床下部において神経炎症や HPA axis の異常を引き起こすことで、末梢における免疫機構の異常な活性化により疼痛を誘発している可能性が考えられる。これら脳内の LPA におけるシグナルは FM において重要な役割を持ち、FM と LPA 合成酵素の関与の解明は新たな病態メカニズムの解明および治療標的となる可能性が考えられる。

総括及び結論

本研究において私は慢性疼痛と LPA 合成酵素に関して検討を行い、以下の新規知見を得た。

第一章

神経障害性疼痛モデルにおいて、LPA 合成酵素のうち sPLA₂-III は神経障害によって脊髄後角で遺伝子発現が増加し、疼痛に関与することを明らかにした。また、sPLA₂-III 阻害薬の探索を行い、sPLA₂-III に対し阻害効果のある #29 および #107 を得た。さらにそれら化合物の前投与および後投与で疼痛抑制効果を持つことを明らかにした。

第二章

FM モデルである IPS モデルにおいて、脳内の LPAR_{1/3} が疼痛に関与することを明らかにした。LPA 合成酵素に関して検討を行ったところ、視床下部において sPLA₂-III の遺伝子発現が増加し、sPLA₂-III-KO マウスで疼痛が抑制されることから、IPS モデルにおける sPLA₂-III の関与を明らかにした。

一方で、IPS モデルの脳内ではミクログリアが活性化し疼痛形成に関与すること、さらにミクログリアの抑制は脾臓細胞誘発性の疼痛を抑制することを明らかにした。

以上、著者は各種マウスモデルを用いて、慢性疼痛と LPA 合成酵素の関与および役割の一端を明らかにした。本研究の成果は LPA が関与する難治性慢性疼痛に対する新規病態メカニズムの解明および治療薬の開発に資する重要な基礎的知見を提供するものである。

謝辞

本研究に際しまして、京都大学大学院薬学研究科 金子周司教授の一貫した研究ならびに教育についてのご指導に対しまして深く感謝いたします。また、この研究テーマに関しては共同研究と研究面におけるご指導を頂いた生産開発科学研究所 植田弘師博士（長崎大学名誉教授）に謹んで感謝の意を表します。また、多くの有益な研究指導ならびに御助言を頂きました京都大学大学院薬学研究科准教授 白川久志博士、同助教 永安一樹博士に心から感謝の意を表します。

本研究の遂行に当たり、sPLA₂-III阻害薬創薬スクリーニングに関して共同研究してくださった、長崎大学 永井潤博士および塚原涼子博士、東京大学化合物ライブラリーの提供を頂いた創薬機構（代表 長野哲雄名誉教授）、sPLA₂-IIIに関する組み換え遺伝子、遺伝子欠損マウスを提供くださった東京大学医学研究科 村上誠教授、武富芳隆講師、疼痛評価実験に関して重要な協力を頂いた長崎大学 根山広行博士（国立研究開発法人理化学研究所 生命機能科学研究センター研究員）に深く感謝いたします。

そして、日々の研究生活において互いに切磋琢磨し、協力していただいた、堂園直貴修士、山下志織さんをはじめとする京都大学大学院薬学研究科生体機能解析学分野ならびに薬品作用解析学分野の皆様にも深く感謝いたします。

本研究の遂行に関しまして植田弘師 博士の日本学術振興会 科学研究費助成事業 基盤研究 (A) [17H01586]、基盤研究 (B) [21H03024]および挑戦的研究 (萌芽) [19K21592]、日本医療研究開発機構 (AMED) [16am0101012j0005]の研究費を御援助いただき、心から感謝の意を表します。

最後に、著者の良き理解者であり研究活動に専念できるよう終始支えてくださった、父 悟、母 真由美、兄 翔真および妻 英里に心から感謝いたします。

論文発表目録

本研究の成果は以下の論文に公表した。

第1章

Secreted PLA₂-III is a possible therapeutic target to treat neuropathic pain

Keigo Tanaka, Naoki Dozono, Hiroyuki Neyama, Jun Nagai, Ryoko Tsukahara, Kazuki Nagayasu, Shuji Kaneko, Hiroshi Ueda.

2021年7月5日発行 Biochemical and Biophysical Research Communications 第568巻第3号 167頁～173頁 doi: 10.1016/j.bbrc.2021.06.058.に掲載

第2章

マウス FM モデルにおける LPA 合成酵素の関与の解明

未発表

引用文献

- [1] Turk DC, Wilson HD, Cahana A. Treatment of chronic non-cancer pain. *Lancet*. 2011 Jun 25;377 (9784) :2226-35.
- [2] Sindrup SH, Otto M, Finnerup NB, Jensen TS. Antidepressants in the treatment of neuropathic pain. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2005 Jun;96 (6) :399-409.
- [3] Lynch ME, Watson CP. The pharmacotherapy of chronic pain: a review. *Pain Res Manag*. 2006 Spring;11 (1) :11-38.
- [4] Riediger C, Schuster T, Barlinn K, Maier S, Weitz J, Siepmann T. Adverse Effects of Antidepressants for Chronic Pain: A Systematic Review and Meta-analysis. *Front Neurol*. 2017 Jul 14;8:307.
- [5] Ueda H, Neyama H, Nagai J, Matsushita Y, Tsukahara T, Tsukahara R. Involvement of lysophosphatidic acid-induced astrocyte activation underlying the maintenance of partial sciatic nerve injury-induced neuropathic pain. *Pain*. 2018 Nov;159 (11) :2170-2178.
- [6] Uchida H, Nagai J, Ueda H. Lysophosphatidic acid and its receptors LPA1 and LPA3 mediate paclitaxel-induced neuropathic pain in mice. *Mol Pain*. 2014 Nov 19;10:71.
- [7] Ueda H, Neyama H, Matsushita Y. Lysophosphatidic Acid Receptor 1- and 3-Mediated Hyperalgesia and Hypoalgesia in Diabetic Neuropathic Pain Models in Mice. *Cells*. 2020 Aug 16;9 (8) :1906.
- [8] Ueda H, Neyama H. LPA1 receptor involvement in fibromyalgia-like pain induced by intermittent psychological stress, empathy. *Neurobiol Pain*. 2017 Apr 17;1:16-25.
- [9] Inoue M, Rashid MH, Fujita R, Contos JJ, Chun J, Ueda H. Initiation of neuropathic pain requires lysophosphatidic acid receptor signaling. *Nat Med*. 2004 Jul;10 (7) :712-8.
- [10] Ueda H, Neyama H. LPA1 receptor involvement in fibromyalgia-like pain induced by intermittent psychological stress, empathy. *Neurobiol Pain*. 2017 Apr 17;1:16-25.
- [11] Ueda H. Lysophosphatidic acid signaling is the definitive mechanism underlying neuropathic pain. *Pain*. 2017 Apr;158 Suppl 1:S55-S65.
- [12] Ueda H. Pathogenic mechanisms of lipid mediator lysophosphatidic acid in chronic pain. *Prog Lipid Res*. 2021 Jan;81:101079.
- [13] Ma L, Uchida H, Nagai J, Inoue M, Aoki J, Ueda H. Evidence for de novo synthesis of lysophosphatidic acid in the spinal cord through phospholipase A2 and autotaxin in nerve injury-induced neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010 May;333 (2) :540-6.
- [14] Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain*. 1990 Nov;43 (2) :205-218.
- [15] Malmberg AB, Basbaum AI. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. *Pain*. 1998 May;76 (1-2) :215-22.

- [16] Kakae M, Tobori S, Morishima M, Nagayasu K, Shirakawa H, Kaneko S. Depletion of microglia ameliorates white matter injury and cognitive impairment in a mouse chronic cerebral hypoperfusion model. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019 Jul 5;514 (4) :1040-1044.
- [17] Ran FA, Cong L, Yan WX, Scott DA, Gootenberg JS, Kriz AJ, Zetsche B, Shalem O, Wu X, Makarova KS, Koonin EV, Sharp PA, Zhang F. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*. 2015 Apr 9;520 (7546) :186-91.
- [18] Deguchi Y, Harada M, Shinohara R, Lazarus M, Cherasse Y, Urade Y, Yamada D, Sekiguchi M, Watanabe D, Furuyashiki T, Narumiya S. mDia and ROCK Mediate Actin-Dependent Presynaptic Remodeling Regulating Synaptic Efficacy and Anxiety. *Cell Rep*. 2016 Nov 22;17 (9) :2405-2417.
- [19] Kohro Y, Sakaguchi E, Tashima R, Tozaki-Saitoh H, Okano H, Inoue K, Tsuda M. A new minimally-invasive method for microinjection into the mouse spinal dorsal horn. *Sci Rep*. 2015 Sep 21;5:14306.
- [20] Neyama H, Dozono N, Ueda H. NR2A-NMDA Receptor Blockade Reverses the Lack of Morphine Analgesia Without Affecting Chronic Pain Status in a Fibromyalgia-Like Mouse Model. *J Pharmacol Exp Ther*. 2020 Apr;373 (1) :103-112.
- [21] Matsumoto M, Xie W, Ma L, Ueda H. Pharmacological switch in Abeta-fiber stimulation-induced spinal transmission in mice with partial sciatic nerve injury. *Mol Pain*. 2008 Jul 11;4:25.
- [22] Neyama H, Dozono N, Ueda H. NR2A-NMDA Receptor Blockade Reverses the Lack of Morphine Analgesia Without Affecting Chronic Pain Status in a Fibromyalgia-Like Mouse Model. *J Pharmacol Exp Ther*. 2020 Apr;373 (1) :103-112.
- [23] Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*. 1988 Jan;32 (1) :77-88.
- [24] Uchida H, Ma L, Ueda H. Epigenetic gene silencing underlies C-fiber dysfunctions in neuropathic pain. *J Neurosci*. 2010 Mar 31;30 (13) :4806-14.
- [25] Koga K, Furue H, Rashid MH, Takaki A, Katafuchi T, Yoshimura M. Selective activation of primary afferent fibers evaluated by sine-wave electrical stimulation. *Mol Pain*. 2005 Mar 25;1:13.
- [26] Matsumoto M, Xie W, Ma L, Ueda H. Pharmacological switch in Abeta-fiber stimulation-induced spinal transmission in mice with partial sciatic nerve injury. *Mol Pain*. 2008 Jul 11;4:25.
- [27] Ueda H. Peripheral mechanisms of neuropathic pain - involvement of lysophosphatidic acid receptor-mediated demyelination. *Mol Pain*. 2008 Apr 1;4:11.
- [28] Hylden JL, Wilcox GL. Intrathecal morphine in mice: a new technique. *Eur J Pharmacol*. 1980 Oct 17;67 (2-3) :313-6.
- [29] HALEY TJ, MCCORMICK WG. Pharmacological effects produced by intracerebral injection of drugs in the conscious mouse. *Br J Pharmacol Chemother*. 1957 Mar;12 (1) :12-5.
- [30] Guissouma H, Froidevaux MS, Hassani Z, Demeneix BA. In vivo siRNA delivery to the mouse

hypothalamus confirms distinct roles of TR beta isoforms in regulating TRH transcription. *Neurosci Lett*. 2006 Oct 9;406 (3) :240-3.

[31] Sato H, Kato R, Isogai Y, Saka G, Ohtsuki M, Taketomi Y, Yamamoto K, Tsutsumi K, Yamada J, Masuda S, Ishikawa Y, Ishii T, Kobayashi T, Ikeda K, Taguchi R, Hatakeyama S, Hara S, Kudo I, Itabe H, Murakami M. Analyses of group III secreted phospholipase A2 transgenic mice reveal potential participation of this enzyme in plasma lipoprotein modification, macrophage foam cell formation, and atherosclerosis. *J Biol Chem*. 2008 Nov 28;283 (48) :33483-97.

[32] Murakami M, Masuda S, Shimbara S, Bezzine S, Lazdunski M, Lambeau G, Gelb MH, Matsukura S, Kokubu F, Adachi M, Kudo I. Cellular arachidonate-releasing function of novel classes of secretory phospholipase A2s (groups III and XII) . *J Biol Chem*. 2003 Mar 21;278 (12) :10657-67.

[33] Götzke H, Kilisch M, Martínez-Carranza M, Sograte-Idrissi S, Rajavel A, Schlichthaerle T, Engels N, Jungmann R, Stenmark P, Opazo F, Frey S. The ALFA-tag is a highly versatile tool for nanobody-based bioscience applications. *Nat Commun*. 2019 Sep 27;10 (1) :4403.

[34] Yung YC, Stoddard NC, Chun J. LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology. *J Lipid Res*. 2014 Jul;55 (7) :1192-214.

[35] Ueda H, Matsunaga H, Olaposi OI, Nagai J. Lysophosphatidic acid: chemical signature of neuropathic pain. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Jan;1831 (1) :61-73.

[36] Murakami M, Sato H, Miki Y, Yamamoto K, Taketomi Y. A new era of secreted phospholipase A2. *J Lipid Res*. 2015 Jul;56 (7) :1248-61.

[37] Labonté ED, Kirby RJ, Schildmeyer NM, Cannon AM, Huggins KW, Hui DY. Group 1B phospholipase A2-mediated lysophospholipid absorption directly contributes to postprandial hyperglycemia. *Diabetes*. 2006 Apr;55 (4) :935-41.

[38] Ohtsuki M, Taketomi Y, Arata S, Masuda S, Ishikawa Y, Ishii T, Takanezawa Y, Aoki J, Arai H, Yamamoto K, Kudo I, Murakami M. Transgenic expression of group V, but not group X, secreted phospholipase A2 in mice leads to neonatal lethality because of lung dysfunction. *J Biol Chem*. 2006 Nov 24;281 (47) :36420-33.

[39] Sato H, Taketomi Y, Ushida A, Isogai Y, Kojima T, Hirabayashi T, Miki Y, Yamamoto K, Nishito Y, Kobayashi T, Ikeda K, Taguchi R, Hara S, Ida S, Miyamoto Y, Watanabe M, Baba H, Miyata K, Oike Y, Gelb MH, Murakami M. The adipocyte-inducible secreted phospholipases PLA2G5 and PLA2G2E play distinct roles in obesity. *Cell Metab*. 2014 Jul 1;20 (1) :119-32.

[40] Hanasaki K, Yamada K, Yamamoto S, Ishimoto Y, Saiga A, Ono T, Ikeda M, Notoya M, Kamitani S, Arita H. Potent modification of low density lipoprotein by group X secretory phospholipase A2 is linked to macrophage foam cell formation. *J Biol Chem*. 2002 Aug 9;277 (32) :29116-24.

[41] Murase R, Taketomi Y, Miki Y, Nishito Y, Saito M, Fukami K, Yamamoto K, Murakami M.

- Group III phospholipase A2 promotes colitis and colorectal cancer. *Sci Rep.* 2017 Sep 25;7 (1) :12261.
- [42] Mitsuishi M, Masuda S, Kudo I, Murakami M. Human group III phospholipase A2 suppresses adenovirus infection into host cells. Evidence that group III, V and X phospholipase A2s act on distinct cellular phospholipid molecular species. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Nov;1771 (11) :1389-96.
- [43] Kudo I, Murakami M. Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002 Aug;68-69:3-58.
- [44] Ma L, Matsumoto M, Xie W, Inoue M, Ueda H. Evidence for lysophosphatidic acid 1 receptor signaling in the early phase of neuropathic pain mechanisms in experiments using Ki-16425, a lysophosphatidic acid 1 receptor antagonist. *J Neurochem.* 2009 Apr;109 (2) :603-10.
- [45] Inoue N, Ito S, Tajima K, Nogawa M, Takahashi Y, Sasagawa T, Nakamura A, Kyoji T. Etodolac attenuates mechanical allodynia in a mouse model of neuropathic pain. *J Pharmacol Sci.* 2009 Apr;109 (4) :600-5.
- [46] Sluka KA, Kalra A, Moore SA. Unilateral intramuscular injections of acidic saline produce a bilateral, long-lasting hyperalgesia. *Muscle Nerve.* 2001 Jan;24 (1) :37-46.
- [47] Nishiyori M, Ueda H. Prolonged gabapentin analgesia in an experimental mouse model of fibromyalgia. *Mol Pain.* 2008 Nov 6;4:52.
- [48] Shimoda T, Liang Z, Suzuki H, Kawana S. Inhibitory effects of antipsychotic and anxiolytic agents on stress-induced degranulation of mouse dermal mast cells. *Clin Exp Dermatol.* 2010 Jul;35 (5) :531-6.
- [49] Murata Y, Narisawa Y, Shimono R, Ohmori H, Mori M, Ohe K, Mine K, Enjoji M. A high fat diet-induced decrease in hippocampal newly-born neurons of male mice is exacerbated by mild psychological stress using a Communication Box. *J Affect Disord.* 2017 Feb;209:209-216.
- [50] Papadopoulos AS, Cleare AJ. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysfunction in chronic fatigue syndrome. *Nat Rev Endocrinol.* 2011 Sep 27;8 (1) :22-32.
- [51] González-Vives S, Díaz-Marsá M, De la Vega I, Palomares N, Vázquez S, López-Villatoro JM, Palomo T, Carrasco JL. Hypothalamic-pituitary axis response to a 0.25-MG dexamethasone test in women with fibromyalgia. *Stress.* 2020 May;23 (3) :284-289.
- [52] Morris MC, Compas BE, Garber J. Relations among posttraumatic stress disorder, comorbid major depression, and HPA function: a systematic review and meta-analysis. *Clin Psychol Rev.* 2012 Jun;32 (4) :301-15.
- [53] Theoharides TC, Tsilioni I, Bawazeer M. Mast Cells, Neuroinflammation and Pain in Fibromyalgia Syndrome. *Front Cell Neurosci.* 2019 Aug 2;13:353.
- [54] Albrecht DS, Forsberg A, Sandström A, Bergan C, Kadetoff D, Protsenko E, Lampa J, Lee YC, Höglund CO, Catana C, Cervenka S, Akeju O, Lekander M, Cohen G, Halldin C, Taylor N, Kim M,

- Hooker JM, Edwards RR, Napadow V, Kosek E, Loggia ML. Brain glial activation in fibromyalgia - A multi-site positron emission tomography investigation. *Brain Behav Immun*. 2019 Jan;75:72-83.
- [55] Fusco R, Siracusa R, D'Amico R, Peritore AF, Cordaro M, Gugliandolo E, Crupi R, Impellizzeri D, Cuzzocrea S, Di Paola R. Melatonin Plus Folic Acid Treatment Ameliorates Reserpine-Induced Fibromyalgia: An Evaluation of Pain, Oxidative Stress, and Inflammation. *Antioxidants* (Basel) . 2019 Dec 6;8 (12) :628.
- [56] Ueda H, Dozono N, Tanaka K, Kaneko S, Neyama H, Uchida H. Allodynia by Splenocytes From Mice With Acid-Induced Fibromyalgia-Like Generalized Pain and Its Sexual Dimorphic Regulation by Brain Microglia. *Front Neurosci*. 2020 Dec 23;14:600166.
- [57] Elmore MR, Najafi AR, Koike MA, Dagher NN, Spangenberg EE, Rice RA, Kitazawa M, Matusow B, Nguyen H, West BL, Green KN. Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron*. 2014 Apr 16;82 (2) :380-97.
- [58] Pernambuco AP, Schetino LP, Alvim CC, Murad CM, Viana RS, Carvalho LS, Reis DÁ. Increased levels of IL-17A in patients with fibromyalgia. *Clin Exp Rheumatol*. 2013 Nov-Dec;31 (6 Suppl 79) :S60-3.
- [59] Rodriguez-Pintó I, Agmon-Levin N, Howard A, Shoenfeld Y. Fibromyalgia and cytokines. *Immunol Lett*. 2014 Oct;161 (2) :200-3.
- [60] Oliveira TG, Chan RB, Bravo FV, Miranda A, Silva RR, Zhou B, Marques F, Pinto V, Cerqueira JJ, Di Paolo G, Sousa N. The impact of chronic stress on the rat brain lipidome. *Mol Psychiatry*. 2016 Jan;21 (1) :80-8.
- [61] Tabbai S, Moreno-Fernández RD, Zambrana-Infantes E, Nieto-Quero A, Chun J, García-Fernández M, Estivill-Torrús G, Rodríguez de Fonseca F, Santín LJ, Oliveira TG, Pérez-Martín M, Pedraza C. Effects of the LPA1 Receptor Deficiency and Stress on the Hippocampal LPA Species in Mice. *Front Mol Neurosci*. 2019 Jun 11;12:146.
- [62] Lind AL, Just D, Mikus M, Fredolini C, Ioannou M, Gerdle B, Ghafouri B, Bäckryd E, Tanum L, Gordh T, Månberg A. CSF levels of apolipoprotein C1 and autotaxin found to associate with neuropathic pain and fibromyalgia. *J Pain Res*. 2019 Oct 15;12:2875-2889.
- [63] Yui D, Nishida Y, Nishina T, Mogushi K, Tajiri M, Ishibashi S, Ajioka I, Ishikawa K, Mizusawa H, Murayama S, Yokota T. Enhanced Phospholipase A2 Group 3 Expression by Oxidative Stress Decreases the Insulin-Degrading Enzyme. *PLoS One*. 2015 Dec 4;10 (12) :e0143518.
- [64] Gijls HL, Willemarck N, Vanderhoydonc F, Khan NA, Dehairs J, Derua R, Waelkens E, Taketomi Y, Murakami M, Agostinis P, Annaert W, Swinnen JV. Primary cilium suppression by SREBP1c involves distortion of vesicular trafficking by PLA2G3. *Mol Biol Cell*. 2015 Jun 15;26 (12) :2321-32.
- [65] Zhang J, Malik A, Choi HB, Ko RW, Dissing-Olesen L, MacVicar BA. Microglial CR3

- activation triggers long-term synaptic depression in the hippocampus via NADPH oxidase. *Neuron*. 2014 Apr 2;82 (1) :195-207.
- [66] Taghibiglou C, Martin HG, Lai TW, Cho T, Prasad S, Kojic L, Lu J, Liu Y, Lo E, Zhang S, Wu JZ, Li YP, Wen YH, Imm JH, Cynader MS, Wang YT. Role of NMDA receptor-dependent activation of SREBP1 in excitotoxic and ischemic neuronal injuries. *Nat Med*. 2009 Dec;15 (12) :1399-406.
- [67] Zhang X, Lei B, Yuan Y, Zhang L, Hu L, Jin S, Kang B, Liao X, Sun W, Xu F, Zhong Y, Hu J, Qi H. Brain control of humoral immune responses amenable to behavioural modulation. *Nature*. 2020 May;581 (7807) :204-208.
- [68] Li Y, Jiang W, Li ZZ, Zhang C, Huang C, Yang J, Kong GY, Li ZF. Repetitive restraint stress changes spleen immune cell subsets through glucocorticoid receptor or β -adrenergic receptor in a stage dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Jan 1;495 (1) :1108-1114.
- [69] Jiang W, Li Y, Sun J, Li L, Li JW, Zhang C, Huang C, Yang J, Kong GY, Li ZF. Spleen contributes to restraint stress induced changes in blood leukocytes distribution. *Sci Rep*. 2017 Jul 26;7 (1) :6501.
- [70] Goebel A, Krock E, Gentry C, Israel MR, Jurczak A, Urbina CM, Sandor K, Vastani N, Maurer M, Cuhadar U, Sensi S, Nomura Y, Menezes J, Baharpoor A, Brieskorn L, Sandström A, Tour J, Kadetoff D, Haglund L, Kosek E, Bevan S, Svensson CI, Andersson DA. Passive transfer of fibromyalgia symptoms from patients to mice. *J Clin Invest*. 2021 Jul 1;131 (13) :e144201.