

京都大学	博士（薬学）	氏名	田中 景吾
論文題目	慢性疼痛に關与するLPA合成酵素の役割とその阻害薬探索に関する研究		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>神経障害性疼痛や線維筋痛症(fibromyalgia:FM)など難治性の慢性疼痛疾患はNSAIDsなどの鎮痛薬が有効性を示さず、抗てんかん薬や抗うつ薬などの薬物が有効性を示すものの、その効果は十分ではなく、また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る。</p> <p>私の所属する研究グループは、脂質メディエーターである lysophosphatidic acid(LPA)が神経障害性疼痛モデルにおける神経損傷によって脊髄で産生され、LPA受容体を介するシグナルにより脊髄後根の脱髄を引き起こし、痛みの誘発及び疼痛維持に關与する重要な分子であることを報告してきた。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合成に關わる酵素群に着目し検討を行った。</p> <p>第一章 マウス神経障害性疼痛モデルにおけるsPLA₂の關与と阻害薬の探索</p> <p>LPA産生にはphospholipase A2(PLA₂)が關与し、生合成機構の一部を担う。PLA₂は分泌型酵素のsPLA₂と細胞内酵素のcPLA₂、iPLA₂の3つのファミリーに分類され、神経障害性モデルにおける研究では、神経損傷後1時間を最大としてcPLA₂とiPLA₂の活性が上昇し、その後3時間でcPLA₂とiPLA₂の活性はほぼ元のレベル低下し、神経傷害前に髓腔内投与したcPLA₂とiPLA₂阻害薬は慢性疼痛を抑制することを報告してきた。しかし、cPLA₂とiPLA₂の活性は低下しているにも関わらず、LPAは神経傷害後でも持続的に疼痛に關与することから、新たにsPLA₂の寄与を考え検討を行った。神経損傷後の脊髄後角の遺伝子発現解析を行ったところsPLA₂の11種のアイソフォームのうちsPLA₂-IIIの発現が神経損傷後6時間で最大となり、その有意な上昇は翌日でも観察された。そこで、脊髄のsPLA₂-IIIのノックダウンの効果を検討するためにsPLA₂-IIIに対するmiRNAを発現するアデノウイルスを脊髄後角実質内に投与したところ、digital von Freyテストによる機械性の疼痛やHargreaves testによる熱性の痛覚過敏が顕著に抑制された。またsPLA₂-IIIに対するsiRNAやAS-ODNの髓腔内投与によっても同様に熱性の痛覚過敏の抑制が観察された。これまでsPLA₂-IIIに対し、有効かつ選択的な阻害薬は報告されていなかったため、21,000の化合物ライブラリーを用いて創薬ハイスループットスクリーニングを行い、2つの候補阻害薬#29と#107を得た。比較実験としてsPLA₂のその他のアイソフォームに対する阻害効果が報告されているluffariellolideとvarespladibも含め検討し</p>			

たところ、varespladibはsPLA₂-IIIに対し阻害効果は発揮せず、luffariellolide および#29がsPLA₂-IIIに対する阻害効果が観察され、その効果は#29の方が強かった。これら阻害薬の髄腔内投与による疼痛評価では#29とluffariellolideが疼痛抑制効果を示したのに対し、varespladibは何ら影響を及ぼさなかった。また#29はいったん形成された疼痛後に腹腔内投与することで疼痛抑制効果を発揮した。以上の結果より、sPLA₂-IIIが神経障害性疼痛に関与し、病態形成及び維持に重要な役割を持つことが明らかにするとともに、sPLA₂-IIIに対する阻害効果をもつ#29を見出し、病態形成後の治療効果を有することを明らかにした。

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

一方、当グループではこれまで心理ストレスによるFMモデルとして、intermittent psychological stress (IPS)-modelを用い、LPA1受容体欠損マウスで疼痛が完全に抑制されることや、いったん形成された慢性疼痛もLPA1受容体拮抗薬の脳室内投与による治療効果が得られたことから、FMモデルにおける脳内のLPAシグナルの重要性を報告してきた。しかし、FMモデルにおけるLPA合成経路に関する詳細なメカニズムは明らかになっていないため、同様にsPLA₂の関与について検討を行った。心理ストレスへの反応に関係の深い視床下部における遺伝子解析を行ったところ、sPLA₂-IIIの遺伝子発現がIPS開始後4日目からIPS後1日で顕著に増加していた。そこでsPLA₂-IIIのKOマウスを用いたところ、FMモデルにおける疼痛が顕著に抑制された。第一章で得られたsPLA₂-IIIの阻害薬の脳室内投与による作用を評価したところ、#29とluffariellolideで疼痛反応を抑制したのに対し、varespladibは何ら影響を及ぼさなかった。このことから、FMモデルにおいてsPLA₂-IIIが疼痛形成に関与することに加え、sPLA₂-IIIの阻害薬の有効性が明らかとなった。

以上、神経障害性疼痛およびFMモデルにおけるLPA合成酵素であるsPLA₂-IIIの発現増加および慢性疼痛への関与を明らかにするとともに、慢性疼痛治療効果を有するsPLA₂-IIIの新たな阻害薬を見いだすことができた。これらLPA合成酵素に関する新たな知見は、病態特異的なLPAシグナルの上流を抑制し、難治性慢性疼痛疾患に対する新たな標的に繋がることが期待される。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

神経障害性疼痛や線維筋痛症(fibromyalgia:FM)など難治性の慢性疼痛疾患はNSAIDsなどの鎮痛薬が有効性を示さず、抗てんかん薬や抗うつ薬などの薬物が有効性を示すものの、その効果は十分ではなく、また副作用の観点からも満足いく治療はなされていないのが現状である。

私の所属する研究グループは、脂質メディエーターである lysophosphatidic acid(LPA)が神経障害性疼痛モデルにおける神経損傷によって脊髄で産生され、LPA 受容体を介するシグナルにより脊髄後根の脱髄を引き起こし、痛みの誘発及び疼痛維持に関与する重要な分子であることを報告してきた。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。そこで申請者は病態特異的な LPA 合成に関わる酵素群に着目し検討を行った。

第1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

LPA 産生には phospholipase A2(PLA₂)が関与し、生合成機構の一部を担う。PLA₂ は分泌型酵素の sPLA₂ と細胞内酵素の cPLA₂、iPLA₂ の3つのファミリーに分類され、神経障害性モデルにおける研究では、神経損傷後1時間を最大として cPLA₂ と iPLA₂ の活性が上昇し、その後3時間で cPLA₂ と iPLA₂ の活性はほぼ元のレベル低下し、神経傷害前に髄腔内投与した cPLA₂ と iPLA₂ 阻害薬は慢性疼痛を抑制することを報告してきた。しかし、cPLA₂ と iPLA₂ の活性は低下しているにも関わらず、LPA は神経傷害後でも持続的に疼痛に関与することから、新たに sPLA₂ の寄与を考え検討を行った。神経損傷後の脊髄後角の遺伝子発現解析を行ったところ sPLA₂ の11種のアイソフォームのうち sPLA₂-IIIの発現が神経損傷後6時間で最大となり、その有意な上昇は翌日でも観察された。そこで、脊髄の sPLA₂-IIIのノックダウンの効果を検討するために sPLA₂-IIIに対する miRNA を発現するアデノウイルスを脊髄後角実質内に投与したところ、digital von Frey テストによる機械性の疼痛や Hargreaves test による熱性の痛覚過敏が顕著に抑制された。また sPLA₂-IIIに対する siRNA や AS-ODN の髄腔内投与によっても同様に熱性の痛覚過敏の抑制が観察された。これまで sPLA₂-IIIに対し、有効かつ選択的な阻害薬は報告されていなかったため、21,000の化合物ライブラリーを用いて創薬ハイスループットスクリーニングを行い、2つの候補阻害薬 #29 と #107 を得た。比較実験として sPLA₂ のその他のアイソフォームに対する阻害効果が報告されている luffariellolide と varespladib も含め検討したところ、varespladib は sPLA₂-III に対し阻害効果は発揮せず、luffariellolide および #29 が sPLA₂-III に対する阻害効果が観察され、その効果は #29 の方が強かった。これら阻害薬の髄腔内投与による疼痛評価では #29 と luffariellolide が疼痛抑制効果を示したのに対し、varespladib は何ら影響を及ぼさなかった。また #29 はいったん形成された疼痛後に腹腔内投与することで疼痛抑制効果を発揮した。以上の結果より、申請者は sPLA₂-III が神経障害性疼痛に関与し、病態形成及び維持に重要な役割を持つことが明らかにするとともに、sPLA₂-III に対する阻害効果をもつ #29 を見出し、病態形成後の治療効果を有することを明らかにした。

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

これまで心理ストレスによる FM モデルとしては intermittent psychological stress (IPS)-model が用いられ、LPA1 受容体欠損マウスで疼痛が完全に抑制されることや、いったん形成された慢性疼痛も LPA1 受容体拮抗薬の脳室内投与による治療効果が得られたことから、FM モデルにおける脳内の LPA シグナルの重要性が報告されている。しかし、FM モデルにおける LPA 合成経路に関する詳細なメカニズムは明らかになっていないため、同様に sPLA₂ の関与について検討が行われた。心理ストレスへの反応に関係の深い視床下部における遺伝子解析を行ったところ、sPLA₂-III の遺伝子発現が IPS 開始後 4 日目から IPS 後 1 日で顕著に増加していた。そこで sPLA₂-III の KO マウスを用いたところ、FM モデルにおける疼痛が顕著に抑制された。第 1 章で得られた sPLA₂-III の阻害薬の脳室内投与による作用を評価したところ、#29 と luffariellolide で疼痛反応を抑制したのに対し、varespladib は何ら影響を及ぼさなかった。このことから、FM モデルにおいて sPLA₂-III が疼痛形成に関与することに加え、sPLA₂-III の阻害薬の有効性が明らかとなった。

以上、神経障害性疼痛および FM モデルにおける LPA 合成酵素である sPLA₂-III の発現増加および慢性疼痛への関与を明らかにするとともに、慢性疼痛治療効果を有する sPLA₂-III の新たな阻害薬を見いだすことができた。これら LPA 合成酵素に関する新たな知見は、病態特異的な LPA シグナルの上流を抑制し、難治性慢性疼痛疾患に対する新たな標的に繋がることが期待される。

よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和 4 年 2 月 17 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： _____ 年 _____ 月 _____ 日以降