

研究課題：「**線維筋痛症をモデルとした慢性疼痛機序の解明と治療法の確立に関する研究**」

研究分担者：所属機関 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科分子薬理学分野
氏名 植田 弘師

[研究要旨]

線維筋痛症は全身性に痛みが生じる難治性慢性疼痛疾患であり、現状では根本的な治療法の確立に至っていない。我々はこれまでにこの病態の病因機構解明および治療基盤確立を目指した基礎研究において本疾患モデルマウス作製に成功し、様々な疼痛の特徴およびその候補治療薬の有効性を報告してきた。本年度はミルタザピン脳室内投与により強力な疼痛抑制作用を示すことを明らかにした。次に、本モデルマウスの脳内疼痛関連領域（ペインマトリックス）の遺伝子解析より慢性疼痛原因因子および抗うつ薬ミルタザピン作用点の候補遺伝子を明らかにした。さらに、標的遺伝子をsiRNA局所投与により、疼痛抑制効果を示すことを明らかにした。

A. 研究目的

本研究は線維筋痛症(FM)の病因機構解明および治療基盤の確立を目指しており、具体的には動物モデルの作成と責任分子の同定および治療薬理学的解析を行うことである。本年度は、これまでに報告しているFMモデルマウスにおける抗うつ薬ミルタザピンの責任領域を同定する為に、脳室内または脊髄くも膜下腔内投与における疼痛抑制作用を検討する。そして、慢性疼痛および疼痛抑制効果に対する責任遺伝子を解析することで本疾患の治療戦略を検討する。さらに、同マウスに対して標的遺伝子siRNAを局所微量投与し、その疼痛抑制効果を検討する。

B. 研究方法

実験動物には6週齢(体重18-22g)のC57BL/6J系雄性マウスを用いた。疼痛評価法には熱刺激あるいは機械刺激誘発性疼痛試験法を用いた。

線維筋痛症モデルマウスの作製

繰り返し寒冷ストレス(ICS)モデル：マウスを夜間は低温で飼育し、昼間は30分ごとに室温(24℃)と低温(4℃)に変化させる環境を2日間繰り返した。また実験期間中、夜間および日中連続して室温(24℃)で飼育したマウスを対照群とした。

薬物投与方法

ICS暴露5日後(以下ICS-P5)マウスに対してミルタザピンを脳室内投与または脊髄くも膜下腔内投与(1 μg/5μl)し、それぞれ薬物投与後30分毎に180分までの疼痛閾値の経時的变化を測定した。

PCR遺伝子解析

ICS-P5マウスを断頭したのち脳内疼痛関連領域

(ペインマトリックス)を採取し、cDNA作成後Real-time PCR法にて評価した。

siRNA脳局所微量投与

ICS暴露3日後(以下ICS-P3)マウスに対してペントバルビタール50 mg/kgで麻酔後、マウス頭部皮膚を切開し標的とする脳領域の頭蓋骨にドリルで穴をあけ脳局所両側にsiRNAを両側にそれぞれ0.1 μg投与した。

(倫理面への配慮)

本研究は長崎大学動物実験委員会(IACUC)による許可を受け、長崎大学動物実験指針および疼痛実験に対する国際委員会で定められる方法準じて実施した。(承認番号：120405号)

C. 研究結果

1. ICSモデルマウスにおける脳室内ミルタザピン投与による疼痛抑制効果

ICS-P5マウスに対してミルタザピンの脳室内投与(1 μg/5μl)を行い、経時的に疼痛閾値を測定したところ、投与30分後において強力な閾値の上昇が観察され、180分後においても疼痛抑制効果は持続していた。しかしながら、翌日にはその疼痛抑制効果は観察されず、疼痛閾値は低下していた。一方、ミルタザピンの脊髄くも膜下腔内投与(1 μg/5μl)を行い、同様に測定したところ、閾値の有意な上昇は認められなかった。

2. ICSモデルマウスにおける脳内疼痛関連領域(ペインマトリックス)遺伝子解析

ICS-P5マウス脳内疼痛関連領域(ペインマトリックス)におけるセロトニン、ノルアドレナリ

ントランスポーター関連遺伝子をReal-time PCR法にて解析した。その結果、中脳水道灰白室(以下PAG)におけるセロトントランスポーター(以下SERT)遺伝子および視床下部におけるアドレナリン受容体alpha 2遺伝子(以下Hypo-ADRA2)の発現上昇が観察された。

3. ICSモデルにおけるHypo-ADRAノックダウンによる疼痛抑制作用の検討

ICS-P3マウスに対してADRA2に対するsiRNAを視床下部両側にそれぞれ0.1 µgの投与を行い、経時的に疼痛閾値を測定したところ、投与2日後から6日後まで閾値の上昇が観察された。従って、視床下部のADRA2はICSにおける疼痛過敏の責任領域の一つである事が明らかになった。

4. ICSモデルにおけるPAG-SERTノックダウンによる疼痛抑制作用の検討

ICS-P3マウスに対してSERTに対するsiRNAをPAG両側にそれぞれ0.1 µgの投与を行い、経時的に疼痛閾値を測定したところ、投与2日後から6日後まで閾値の上昇が観察された。従って、PAGのSERTはICSにおける疼痛過敏の責任領域の一つである事が明らかになった。

5. ICSモデルにおけるsiRNA処置条件下における全身性ミルタザピン疼痛抑制効果の検討

ICS-P3マウスに対してPAG-SERTおよびHypo-ADRA2投与3日後(ICS-P6)にミルタザピン0.3 mg/kg、また投与4日後(ICS-P7)にミルタザピン1 mg/kgをそれぞれ投与し疼痛抑制効果を検討した。すると、いずれの場合もsiRNAによる疼痛抑制効果に加えミルタザピンによる一過性の疼痛抑制効果が用量依存的に観察された。従って、これら2つの疼痛過敏責任領域以外にミルタザピン効果の責任領域が存在する可能性が示唆された。さらなる解析が必要である事が必要である。

D. 健康危険情報
特になし

E. 研究発表

- 1) Halder SK, Matsunaga H, Yamaguchi H, Ueda H: Novel neuroprotective action of prothymosin alpha-derived peptide against retinal and brain ischemic damages. *J Neurochem.* 125(5):713-723 2013 Jun
- 2) Matsushita Y, Omotuyi IO, Mukae T, Ueda H: Microglia Activation Precedes the Anti-Opioid BDNF and NMDA Receptor Mechanisms Underlying

Morphine Analgesic Tolerance. *Curr Pharm Des. (in press)*

3) Uchida H, Matsushita Y, Ueda H :Epigenetic regulation of BDNF expression in the primary sensory neurons after peripheral nerve injury: implications in the development of neuropathic pain. *Neuroscience.* 240:147-154 2013

4) Halder SK, Sugimoto J, Matsunaga H, Ueda H : Therapeutic benefits of 9-amino acidpeptide derived from prothymosin alpha against ischemic damages. *Peptides.*43 : 68-75 2013May

5) Halder SK, Matsunaga H, Ish KJ 2nd, Akira S, Miyake K, Ueda H : Retinal cell type-specific prevention of ischemia-induced damages by LPS-TLR4 signaling through microglia. *J Neurochem.* 126(2):243-260 2013 Jul

6) Miyabe Y, Miyabe C, Iwai Y, Takayasu A, Fukuda S, Yokoyama W, Nagai J, Jona M, Tokuhara Y, Okawa R, Ovaa H, Aoki J, Chun J, Yatomi Y, Ueda H, Miyasaka M, Miyasaka N,Nanki T: Necessity of lysophosphatidic acid receptor LPA1 is essential for development of arthritis. *Arthritis & Rheumatism.* 65(8):2037-2047 2013 Aug

7) Ma L, Nagai J, Chun Jerold,Ueda H: An LPA species (18:1 LPA) plays key roles in the self-amplification of spinal LPA production in the peripheral neuropathic pain model. *Mol Pain.* 9(1):29 (in press)

8) Yano R, Ma L, Nagai J, Ueda H.Interleukin-1β Plays Key Roles in LPA-Induced Amplification of LPA Production in Neuropathic Pain Model. *Cell Mol Neurobiol.* 33(8):1033-41 2013 Nov

9) Matsushita Y, Araki K, Omotuyi OI, Mukae T, Ueda H. HDAC inhibitors restore C-fiber sensitivity in experimental neuropathic pain model. *Br J Pharmacol.* 170(5):991-8 2013 Jul

10) Omotuyi OI, Ueda H. A Novel Unified Ab initio and template-based Approach to GPCR Modeling: Case of EDG-LPA Receptors. *Current Bioinformatics.*8(5) : 603-610 2013 Nov

11) Omotuyi OI, Ueda H.Descriptor-based Fitting of Structurally Diverse LPA1 Inhibitors into a Single predictive Mathematical Model. *Journal of Physical Chemistry & Biophysics.*3:3 2013Jul

2. 学会発表

- 1) 植田弘師：神経障害性疼痛における脂質メダイエーターの役割、Cinderella研究会、2013年6月14日(大阪)
- 2) Matsushita Y, Ueda H:Microglial activation precedes anti-opioid system in morphine

analgesic tolerance. International Narcotics Research Conference 2013,2013年7月18日(ケアンズ) ポスター

3) 植田弘師：慢性疼痛とリゾホスファチジン酸(LPA)、第46回広島神経医科学研究会、2013年7月26日(広島)

Ueda H ,Nagai J, Mukae T: Central pain and lysophosphatidic acid.FASEB2013,2013年8月7日 (北海道)

4) Nagai J, Ueda H:Evidence for early and late-phase lysophosphatidic acid production underlying neuropathic pain, indicates new therapeutic targets.FASEB2013,2013年8月7日 (北海道) ポスター

5) Ueda H, Nagai J, Mukae T, Matsushita Y: Blockade of lysophosphatidic acid receptor signaling completely cures the established chronic pain. 13th Int'l Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases, 2013年11月6日

6) Matsushita Y, Ueda H:Anti-opioid microglia-BDNF-NMDA receptor system in morphine analgesic tolerance.Neuroscience2013,2013年11月11日 (サンディエゴ) ポスター

7) Mukae T, Ueda H:Pharmacological comparison of therapeutics in experimental fibromyalgia-like model mice using intermittent cold stress or intramuscular injection of acidic saline.Neuroscience.2013,2013年11月11日(サンディエゴ) ポスター

8) Yarimizu D, Kondo H,Nagai J, Ueda H: LPA1 receptor signaling is involved in the post-stroke neuropathic pain following thrombosis and tPA-treatment in mice.Neuroscience2013,2013年11月11日(サンディエゴ) ポスター

9) Ueda H Nagai J:Roles of amplification of LPA synthesis through microglial activation in neuropathic pain,The 5th Asian Pain Symposium,2013年12月15日(岡崎)

出願人：長崎大学

出願日：2012年12月6日

2 実用新案登録
なし

3 その他

F. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1 特許取得

1) 植田弘師

出願番号：特願2012-267599

発明者：植田弘師

発明の名称：線維筋痛症の予防または治療薬

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌(海外)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Halder SK, Matsunaga H, Yamaguchi H, Ueda H	Novel neuroprotective action of prothymosin alpha-derived peptide against retinal and brain ischemic damages.	<i>J Neurochem.</i>	125(5)	713-723	2013
Matsushita Y, Omotuyi IO, Mukae T, Ueda H	Microglia Activation Precedes the Anti-Opioid BDNF and NMDA Receptor Mechanisms Underlying Morphine Analgesic Tolerance.	<i>Curr Pharm Des.</i>	19(42)	7355-61	2013
Uchida H, Matsushita Y, Ueda H	Epigenetic regulation of BDNF expression in the primary sensory neurons after peripheral nerve injury: implications in the development of neuropathic pain.	<i>Neuroscience.</i>	240	147-154	2013
Halder SK, Matsunaga H, Ish KJ 2nd, Akira S, Miyake K, Ueda H	Retinal cell type-specific prevention of ischemia-induced damages by LPS-TLR4 signaling through microglia.	<i>J Neurochem.</i>	126(2)	243-260	2013
Miyabe Y, Miyabe C, Iwai Y, Takayasu A, Fukuda S, Yokoyama W, Nagai J, Jona M, Tokuhara Y, Okawa R, Ovaa H, Aoki J, Chun J, Yatomi Y, Ueda H, Miyasaka M, Miyasaka N, Nanki T	Necessity of lysophosphatidic acid receptor LPA1 is essential for development of arthritis.	<i>Arthritis & Rheumatism.</i>	65(8)	2037-2047	2013
Ma L, Nagai J, Chun Jerold, Ueda H	LPA species (18:1 LPA) plays key roles in the self-amplification of spinal LPA production in the peripheral neuropathic pain model.	<i>Mol Pain.</i>	9(1)	29	2013
Yano R, Ma L, Nagai J, Ueda H	Interleukin-1 β Plays Key Roles in LPA-Induced Amplification of LPA Production in Neuropathic Pain Model.	<i>Cell Mol Neurobiol.</i>	33(8)	1033-41	2013
Matsushita Y, Araki K, Omotuyi OI, Mukae T, Ueda H.	HDAC inhibitors restore C-fiber sensitivity in experimental neuropathic pain model.	<i>Br J Pharmacol.</i>	170(5)	991-8	2013
Omotuyi OI, Ueda H.	A Novel Unified Ab initio and template-based Approach to GPCR Modeling: Case of EDG-LPA Receptors.	<i>Current Bioinformatics.</i>	8(5)	603-610	2013
Omotuyi OI, Ueda H	Descriptor-based Fitting of Structurally Diverse LPA1 Inhibitors into a Single predictive Mathematical Model.	<i>Journal of Physical Chemistry & Biophysics.</i>	3	3	2013

雑誌(国内)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
-------	---------	------	----	-----	-----

植田 弘師 永井 潤	慢性疼痛創薬標的としての リゾホスファチジン酸	遺伝子医学MOOK	24号	260-266	2013
---------------	----------------------------	-----------	-----	---------	------