104　核内受容体REV-ERBを標的とした鎮痛薬の開発

森岡　徳光

【目的】近年、高齢化を背景に痛みを有する患者数が著しく増加している（本邦では約 2,300 万人の慢性疼痛患者が存在)。慢性疼痛は生活の質を低下させ、労働・学習意欲が減退するため、国家的損失に係わる問題であるが、オピオイドや NSAIDs など既存の鎮痛薬が奏功しない。それ故、慢性疼痛発症に関わるメカニズムを明らかにするとともに、新たな作用機序を有する鎮痛薬の創製が必要不可欠である。

脳・脊髄におけるミクログリアやアストロサイトといったグリア細胞の活性化に伴う炎症反応は、慢性疼痛を惹起する重要な機構の一つである。本研究で着目した REV-ERB は炎症反応の制御に関わる核内受容体であり、REV-ERB 作動薬が REV-ERB に結合することで複合体を形成し、これがさらに特定遺伝子のプロモーター領域に結合することで、サイトカインやケモカインなどの炎症性物質の遺伝子発現を転写レベルで抑制することが知られている（図)。

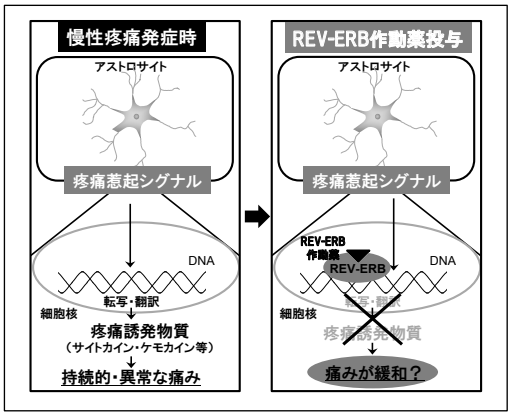
一方で、慢性疼痛に対する REV-ERB の役割・機能に関しては全く研究がなされていない。そこで、我々は培養脊髄アストロサイト及び慢性疼痛モデルマウスを用いて、新規鎮痛薬標的としての REV-ERB の可能性を検討した。

【方法】Wistar 系ラット新生仔（生後 1 日）脊髄より培養アストロサイトを調製した。雄性 ddy 系マウス（5 週齢）を用いて慢性疼痛モデルを作製した。これらの機械的刺激に対する逃避閾値を von Frey filaments により測定することで疼痛反応を評価した。脊髄アストロサイトの活性化は、glial fibrillary acidic protein（GFAP）の発現量を免疫組織化学法により測定することで評価した。疼痛誘発物質の mRNA 発現量は real-time PCR 法、タンパク発現量は ELISA 法にてそれぞれ測定した。REV-ERB の knockdown は RNA 干渉法により行った。

【結果】培養脊髄アストロサイトに lipopolysaccharide（LPS）を処置することによる疼痛誘発物質 interleukin-1β（IL-1β)、interleukin-6（IL-6）及びマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）-9 発現の増大反応は、REV-ERB 作動薬 SR9009 を前処置することにより有意に抑制された。疼痛誘発物質の発現増大に対する SR9009 の抑制効果への REV-ERB の関与を明らかにする目的で RNA 干渉法を用いて検討を行ったところ、REV-ERB の knockdown により SR9009 の抑制効果は有意に低下した。

マウス脊髄くも膜下腔内に LPS を投与すると、機械的刺激に対する逃避閾値の低下が認められた。SR9009 を脊髄くも膜下腔内に前処置することにより LPS による機械的刺激に対する逃避閾値の低下は有意に抑制された。LPS モデルにおいて、脊髄後角での IL-1β mRNA 及び IL-6 mRNA 発現の有意な増大が認められたが、MMP-9 mRNA 発現に変化は認められなかった。さらに LPS モデルの脊髄後角における IL-1β mRNA 及び IL-6 mRNA 発現の増大反応は、SR9009 を前処置することにより有意に抑制された。また LPS モデルにおいて、脊髄後角での GFAP 発現の増大が認められたが、この反応は SR9009 を前処置することにより有意に抑制された。加えて、炎症性疼痛モデルならびに神経障害性疼痛モデルの機械的刺激に対する逃避閾値の低下に対する SR9009 の効果を検討したところ、いずれの疼痛モデルに対しても SR9009 を脊髄くも膜下腔内に投与することにより有意な抑制効果が認められた。

REV-ERB 作動薬による鎮痛作用メカニズム



104. 核内受容体 REV-ERB を標的とした鎮痛薬の開発

森岡　徳光

広島大学 大学院医歯薬保健学研究科 薬効解析科学

Key words：慢性疼痛，アストロサイト，REV-ERB，核内受容体，鎮痛薬

緒　言

神経障害性疼痛、がん性疼痛、糖尿病性疼痛、帯状疱疹後痛などの疼痛は慢性かつ難治性である。その理由として、慢性疼痛は発症から維持過程において多様な機構が関与しているため、既存の鎮痛薬が奏功しないことが挙げられる。それ故、慢性疼痛の発症に関わる多くのメカニズムを明らかにするとともに、新たな作用機序を有する鎮痛薬の創製が必要不可欠である。

痛みの伝達の最重要部位である脊髄後角ではミクログリアやアストロサイトなどのグリア細胞が神経シナプスを取り囲むように存在し、シナプス伝達の制御や神経回路網の再構築などに関わっている。これまでに、慢性化した痛みの伝達には、グリア細胞の活性化が寄与していることが明らかとなっている［1］。それ故、脊髄ミクログリアやアストロサイトの機能異常による痛み伝達の変調を改善するメカニズムを明らかにすることが、有効な鎮痛薬開発に向けた重要な戦略と言える。

痛みの伝達経路における炎症反応は、慢性疼痛を惹起する重要な機構の 1 つである。慢性疼痛時における脊髄後角では、活性化されたグリア細胞から炎症性サイトカインやケモカインの産生が亢進し、慢性的な炎症反応が生じていることが知られている［1］。一方で、非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）は鎮痛薬として繁用されるが、神経障害性疼痛などの慢性疼痛には著効しない。これらの知見は NSIADs の作用機序とは異なるメカニズムを介して炎症反応を緩和させる薬物が、新たな鎮痛薬候補となりうる可能性を示唆している。

我々は、慢性疼痛を緩和する新たな創薬ターゲットとして核内受容体である REV-ERB に着目した。核内受容体は、様々な疾患に対する新たな創薬標的として注目を集めている。例えば、糖尿病治療薬ピオグリタゾンや脂質異常症治療薬ベザフィブラートは核内受容体 peroxisome proliferator-activated receptor に作用することで、糖や脂質代謝に関連する遺伝子発現を調節することで治療効果を発揮する。一方で、REV-ERB は、炎症反応の制御に関わる核内受容体である［2］。REV-ERB 作動薬が REV-ERB に結合することで複合体を形成し、これがさらに特定遺伝子のプロモーター領域に結合することで、遺伝子発現を転写レベルで抑制することが知られている。さらに、炎症が病態の基盤となる脂質異常症やアテローム性動脈硬化などのモデル動物において、合成 REV-ERB 作動薬がマクロファージからの炎症性物質産生を抑制することで、病態の改善効果を有していることが報告されている［2，3］。

以上の知見に基づき、我々は REV-ERB を介した炎症制御機構が慢性疼痛緩和への有望な創薬ターゲットとなる可能性に着目した。先行研究において我々は、アストロサイト細胞株である C6 細胞において、合成 REV-ERB 作動薬処置により炎症性物質産生が転写レベルで抑制されることを明らかにし、中枢神経系細胞での REV-ERB 作動薬の抗炎症効果を報告している［4］。一方で、疼痛制御に対する REV-ERB の関与については全く検討が行われていなかった。本研究では、培養脊髄アストロサイトおよび慢性疼痛モデルマウスを用いて、REV-ERB 作動薬である SR9009 の鎮痛効果ならびにその作用メカニズムについて検討を行ったところ、SR9009 は脊髄アストロサイトにおける疼痛誘発物質産生を抑制することで疼痛緩和効果を有することが明らかとなった［5］。

方　法

1. 培養脊髄アストロサイトの作製およびそれらを用いた解析

Wistar 系ラット新生仔（生後 1 日）より脊髄を摘出し、酵素処理分散法にて混合グリア細胞を作製した。これらを約 3 週間培養後、激しく振とうすることでミクログリア等を除去することによりアストロサイトを調製した。疼痛誘発物質の mRNA 発現量は real-time PCR 法、タンパク発現量は ELISA 法にてそれぞれ測定した。マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）-9 の酵素活性は gelatin zymography にて測定した。REV-ERB の knockdown は RNA 干渉法により行った。

2. 疼痛モデルの作製とそれらを用いた解析

雄性 ddy 系マウス（5 週齢）を用いて慢性疼痛モデルを作製した。炎症性疼痛モデルとして lipopolysaccharide（LPS）脊髄くも膜下腔内投与モデル（LPS モデル）および complete Freund’s adjuvant 足底投与モデル（CFA モデル）、神経障害性疼痛モデルとして、坐骨神経部分結紮による partial sciatic nerve ligation（PSNL）モデル、抗がん薬 paclitaxel 全身投与モデル（PTX モデル）、streptozatocin 全身投与による糖尿病性疼痛モデル（STZ モデル）をそれぞれ用いた。これらの機械的刺激に対する逃避閾値を von Frey filaments により測定することで疼痛反応を評価した。脊髄後角のアストロサイトの活性化は、アストロサイトの活性化マーカーである glial fibrillary acidic protein（GFAP）の発現量を免疫組織化学法により測定することで評価した。脊髄後角の疼痛誘発物質の mRNA 発現量は real-time PCR により測定した。

結　果

1. 培養脊髄アストロサイトにおける疼痛誘発物質産生に対する REV-ERB 作動薬の効果

培養脊髄アストロサイトに LPS を処置すると、疼痛誘発物質（interleukin-1β（IL-1β）、interleukin-6（IL-6）及び MMP-9）の発現が mRNA 及びタンパク質レベルで増大した。LPS による IL-1β mRNA、IL-6 mRNA 及び MMP-9 mRNA 発現の増大反応は、REV-ERB 作動薬である SR9009 を前処置することにより濃度依存的に有意に抑制された（図 1）。SR9009 を単独で処置することによっては疼痛誘発物質の発現に対して影響は認められなかった。また SR9009 は tumor necrosis factor（TNF）処置による IL-1β mRNA、IL-6 mRNA 及び MMP-9 mRNA 発現の増大反応に対しても有意な抑制効果を示した。加えて、LPS による IL-1β、IL-6 及び MMP-9 のタンパク質レベルでの増大に対しても SR9009 は有意な抑制効果を示した。疼痛誘発物質の発現増大に対する SR9009 の抑制効果への REV-ERB の関与を確認する目的で RNA 干渉法を用いて検討を行ったところ、REV-ERB の knockdown により SR9009 の抑制効果は有意に低下した。

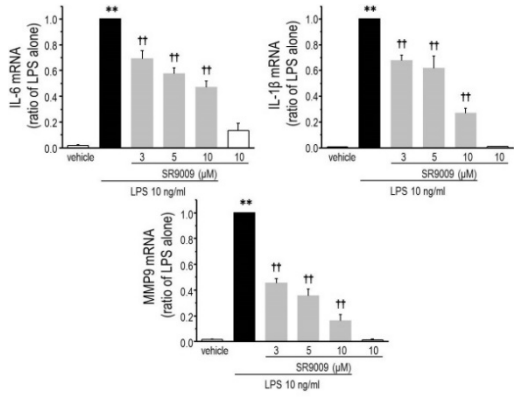


図 1. 培養脊髄アストロサイトにおける LPS による疼痛誘発物質発現に対する SR9009 の効果
培養脊髄アストロサイトに対してそれぞれの濃度の SR9009 を 30 分間前処置した後、LPS を 24 時間処置した後の疼痛誘発物質の mRNA 発現変化を示す。統計処理は Tukey-Kramer 法により行った。$^{**}P < 0.01$ vs. vehicle、$^{††}P < 0.01$ vs. LPS alone

近年、REV-ERB による遺伝子発現抑制作用に histone deacetylase 3（HDAC3）が関与している可能性が示唆されている［4］。そこで疼痛誘発物質の発現増大に対する SR9009 の抑制効果への HDAC3 の関与を検討した。その結果、HDAC3 選択的阻害薬である RGFP966 を前処置したところ、LPS による IL-1β mRNA 及び IL-6 mRNA 発現増大に対する SR9009 の抑制効果は有意に低下したものの、MMP-9 mRNA 発現増大に対する SR9009 の抑制効果に対しては無影響であった。

2. 疼痛モデルマウスの疼痛反応に対する REV-ERB 作動薬の効果

マウス脊髄くも膜下腔内に LPS を投与すると（LPS モデル）、1 時間後より機械的刺激に対する逃避閾値の有意な低下が認められ、この反応は 24 時間持続した（図 2）。これらに対して SR9009 を脊髄くも膜下腔内に前処置することにより、LPS による機械的刺激に対する逃避閾値の低下は有意に抑制された（図 2）。LPS モデルにおいて、脊髄後角での IL-1β mRNA 及び IL-6 mRNA 発現の有意な増大が認められたが、MMP-9 mRNA 発現に変化は認められなかった。さらに LPS モデルの脊髄後角における IL-1β mRNA 及び IL-6 mRNA 発現の増大反応は、SR9009 を前処置することにより有意に抑制された。また LPS モデルにおいて、脊髄後角での GFAP 発現の増大が認められたが、この反応は SR9009 を前処置することにより有意に抑制された。

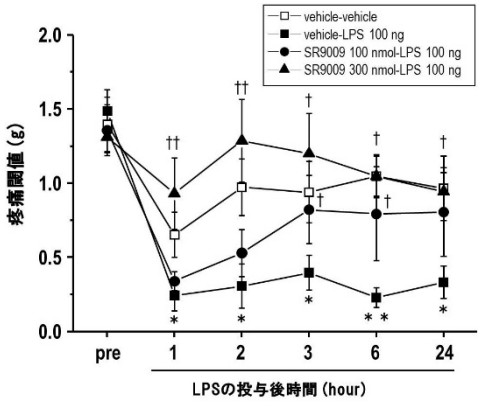


図 2. LPS 誘発性疼痛に対する SR9009 の鎮痛効果

マウス脊髄くも膜下腔内に各用量の SR9009 を投与し、1 時間後に LPS を脊髄くも膜下腔内に投与した。その後、経時的に機械的刺激に対する逃避閾値を測定した。統計処理は two-way repeated-measures ANOVA 及び Tukey-Kramer 法により行った。*P < 0.05、**P < 0.01 vs. vehicle-vehicle、†P < 0.05、††P < 0.01 vs. vehicle-LPS

炎症性疼痛モデルである CFA モデルならびに神経障害性疼痛モデルである PSNL モデル、PTX モデルおよび STZ モデルの機械的刺激に対する逃避閾値の低下に対する SR9009 の効果を検討したところ、SR9009 を脊髄くも膜下腔内に投与することによりすべてのモデルの疼痛反応が有意に抑制された。さらに、PSNL モデルの脊髄後角で認められる GFAP 発現の増大は、SR9009 を前処置することにより有意に抑制された。

考　察

痛みの慢性化には脊髄アストロサイトの活性化が寄与しており、さらにアストロサイト阻害薬が鎮痛効果を示すことが報告されていることから、脊髄アストロサイト活性の制御が鎮痛作用メカニズムとして有望な候補である可能性が示唆されている。REV-ERB はマクロファージなどの炎症性細胞の活性を抑制することが報告されているが［2］、アストロサイト活性に対する役割や疼痛制御への関与については全く検討がなされていなかった。本研究結果より、REV-ERB 作動薬は LPS および TNF といった炎症性刺激による疼痛誘発物質の発現増大を著明に抑制したことから、REV-ERB は特定の刺激に対して限定的な作用を示すのではなく、炎症刺激に伴う遺伝子発現変化に影響を及ぼす可能性が示唆された。

本研究で使用したSR9009はREV-ERB以外の核内受容体に親和性を示さないことが報告されている[3]。さらに、脊髄アストロサイトにおけるREV-ERBをknockdownすることによりSR9009の効果が有意に消失したことから、SR9009による疼痛誘発物質発現の抑制作用はREV-ERB依存的である可能性が示唆された。REV-ERBにはREV-ERBα及びREV-ERBβが存在しており、細胞種により役割が異なる可能性が知られている[6]。本研究において、両サブタイプをknockdownすることでSR9009の効果は消失したが、REV-ERBサブタイプを個々にknockdownすることによってはSR9009の抑制効果に対して無影響であったことから、脊髄アストロサイトにおける疼痛誘発物質の発現制御にはREV-ERBα及びREV-ERBβの両サブタイプが関与していることが示唆された。

REV-ERBはHDAC3をリクルートさせることでヒストン脱アセチル化を促進し、遺伝子転写を抑制することが知られている。本研究では、脊髄アストロサイトにおけるLPS誘発性IL-1β mRNA及びIL-6 mRNA発現に対するSR9009の抑制効果はHDAC3を介していることが示された。一方で、脊髄アストロサイトでのREV-ERBによるMMP-9 mRNA発現制御に関してはHDAC3が介在しておらず、遺伝子によりREV-ERBを介した発現制御メカニズムが異なる可能性が示唆された。

疼痛モデルマウスを用いてSR9009の鎮痛効果を検討したところ、複数タイプの疼痛モデルに認められる機械的刺激に対する疼痛閾値の低下反応が抑制され、これらの効果には脊髄アストロサイト活性化の抑制に伴う疼痛誘発物質産生の低下が寄与している可能性が示唆された。本研究でのREV-ERB作動薬の効果についてはIL-1β及びIL-6発現に対してのみの検討であったが、これら以外の疼痛誘発物質の発現制御にも関与している可能性があり、今後検討が必要である。また現在、慢性疼痛発症に重要な役割を担うミクログリアの機能に対するREV-ERB作動薬の効果についても検討を進めている。今後、REV-ERBによる疼痛制御メカニズムの全貌を明らかにすることで、新たな鎮痛薬候補としてのREV-ERB作動薬の可能性を提示したいと考えている。

文　献

1) Grace, P.M., Hutchinson, M.R., Maier, S.F., Watkins, L.R., Pathological pain and the neuroimmune interface. Nat Rev Immunol, 2014, 14, 217-231. PMID: 24577438 DOI: 10.1038/nri3621.

2) Sato, S., Sakurai, T., Ogasawara, J., Takahashi, M., Izawa, T., Imaizumi, K., Taniguchi, N., Ohno, H., Kizaki, T., A circadian clock gene, Rev-erbα, modulates the inflammatory function of macrophages through the negative regulation of Ccl2 expression. J Immunol, 2014, 192, 407-417. PMID: 24307731 DOI: 10.4049/jimmunol.1301982.

3) Solt, L.A., Wang, Y., Banerjee, S., Hughes, T., Kojetin, D.J., Lundasen, T., Shin, Y., Liu, J., Cameron, M.D., Noel, R., Yoo, S.H., Takahashi, J.S., Butler, A.A., Kamenecka, T.M., Burris, T.P., Regulation of circadian behaviour and metabolism by synthetic REV-ERB agonists. Nature, 2012, 485, 62-68. PMID: 22460951 DOI: 10.1038/nature11030.

4) Morioka, N., Tomori, M., Zhang, F.F., Saeki, M., Hisaoka-Nakashima, K., Nakata, Y., Stimulation of nuclear receptor REV-ERBs regulates tumor necrosis factor-induced expression of proinflammatory molecules in C6 astroglial cells. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 469, 151-157. PMID: 26616049 DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.11.086.

5) Morioka, N., Kodama K., Tomori, M., Yoshikawa K., Saeki, M., Nakamura Y., Zhang, F.F., Hisaoka-Nakashima, K., Nakata, Y., 2016. Stimulation of nuclear receptor REV-ERBs suppresses production of pronociceptive molecules in cultured spinal astrocytes and ameliorates mechanical hypersensitivity of inflammatory and neuropathic pain of mice. Brain Behav Immun, in press. PMID: 30682503 DOI: 10.1016/j.bbi.2019.01.014.

6) Ramakrishnan, S.N., Lau, P., Burke, L.J., Muscat, G.E., Rev-erbbeta regulates the expression of genes involved in lipid absorption in skeletal muscle cells: evidence for cross-talk between orphan nuclear receptors and myokines. J Biol Chem, 2005, 280, 8651-8659. PMID: 15623503 DOI: 10.1074/jbc.M413949200.