長鎖脂肪酸受容体 G protein-coupled receptor 40 (GPR40) を介した docosahexaenoic acid (DHA) の抗侵害作用機構

中本賀寿夫, 西中 崇, 里 尚也, 万倉三正, 小山 豊, 徳山尚吾*

Antinociceptive Effect of Docosahexaenoic Acid (DHA) through Long Fatty Acid Receptor G Protein-coupled Receptor 40 (GPR40)

Kazuo Nakamoto, Takashi Nishinaka, Naoya Sato, Mitsumasa Mankura,
Yutaka Koyama, and Shogo Tokuyama*

*Department of Clinical Pharmacy, Kobe Gakuin University; School of Pharmaceutical
Sciences, 1-1-3 Minatojima, Chuo-ku, Kobe 650-8586, Japan.*

(Received September 10, 2013)

Fatty acids, one class of essential nutrients for humans, are an important source of energy and an essential component of cell membranes. They also function as signal transduction molecules in a variety of biological phenomena. The important functional role of fatty acids in both onset and suppression of pain has become increasingly apparent in recent years. Recently, we have also demonstrated that the release of an endogenous opioid peptide, β -endorphin, plays an important role in the induction of docosahexaenoic acid (DHA)-induced antinociception. It is well known that fatty acids affect intracellular and intercellular signaling as well as the membrane fluidity of neurons. In addition to intracellular actions, unbound free fatty acids (FFAs) can also carry out extracellular signaling by stimulating the G protein-coupled receptor (GPCR). Among these receptors, G protein-coupled receptor 40 (GPR40) has been reported to be activated by long-chain fatty acids such as DHA, eicosapentaenoic acid (EPA) and arachidonic acid. In the peripheral area, GPR40 is preferentially expressed in pancreatic β -cells and is known to relate to the secretion of hormone and peptides. On the other hand, even though this receptor is widely distributed in the central nervous system, reports studying the role and functions of GPR40 in the brain have not been found. In this review, we summarize the findings of our recent study about the long-chain fatty acid receptor GPR40 as a novel pain regulatory system.

Key words—G protein-coupled receptor 40; docosahexaenoic acid; antinociceptive effect; β -endorphin

はじめに

脂肪酸は栄養素や生体膜脂質の構成成分であるだけでなく,¹⁾ 脂溶性シグナル伝達分子として多彩な生理作用を有しており, 細胞の生命活動を担っている。²⁾

脂肪酸は二重結合を持たない飽和脂肪酸と二重結合や三重結合を持つ不飽和脂肪酸に分類される。さらに, 不飽和脂肪酸では, 二重結合が1つのものは一価不飽和脂肪酸, 二重結合が2つ以上のものは多価不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid; PUFA) として分類される。また, PUFA には α -リノレン

酸 ($C_{18:3}$), エイコサペンタエン酸 (eicosapentaenoic acid; EPA, $C_{20:5}$), ドコサヘキサエン酸 (docosahexaenoic acid; DHA, $C_{22:6}$) に代表される *n*-3 系脂肪酸と, リノール酸 ($C_{18:2}$), γ -リノレン酸 ($C_{18:3}$) やアラキドン酸 ($C_{20:4}$) に代表される *n*-6 系脂肪酸がある。³⁾

近年, 脂肪酸の生理・薬理作用に関する種々の報告は, 脂肪酸の摂取量や分布バランスの相違によって, 脂肪酸が様々な生理機能を発揮する可能性が示唆されている。それらの機能の1つとして, 脂肪酸の疼痛制御への関与がある。特に, 不飽和脂肪酸及びその代謝物と痛みに関する報告がここ数年の間に集積してきている。下記に, これまでに報告されている *n*-3 系脂肪酸と疼痛制御の関係について概説する。

The authors declare no conflict of interest.

神戸学院大学薬学部臨床薬学研究室 (〒650-8586 神戸市中央区港島 1-1-3)

*e-mail: stoku@pharm.kobegakuin.ac.jp

本総説は, 日本薬学会第 133 年会シンポジウム S30-102 で発表した内容を中心に記述したものである。

***n*-3 系脂肪酸と疼痛制御との関連**

魚油に多く含まれる *n*-3 系脂肪酸は、必須脂肪酸として様々な生理作用を発揮し、生体のホメオスタシス維持に重要な役割を果たしている。最近、*n*-3 系脂肪酸の疼痛制御における役割が注目され、関節リウマチ、⁴⁾ 月経困難症や炎症性腸疾患⁵⁾などの炎症性疼痛を抑制するとの多くの基礎研究報告がなされている。*n*-3 系脂肪酸は炎症性サイトカインや炎症性エイコサノイドの産生を抑制する⁶⁾ことから、*n*-3 系脂肪酸による疼痛制御機序に抗炎症作用が寄与している可能性が考えられている。さらに、*n*-3 系脂肪酸である α -リノレン酸の摂取は、神経障害性疼痛の進行に関与する因子とされるリゾフォスファチジン酸の産生を抑制するとの報告もある。⁷⁾ また最近では、DHA が p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) の活性化を介したミクログリア由来の炎症性サイトカインの抑制に関与しているとの報告もある。⁸⁾ このように、*n*-3 系脂肪酸の摂取は、神経障害性疼痛や炎症性疼痛を抑制できる可能性も示唆されている。⁹⁾

一方、臨床試験に転じると、Goldberg らの 17 のランダムコントロール試験のメタ・アナリシスにおいて、関節リウマチ、炎症性腸疾患や月経困難症などの炎症性疼痛と *n*-3 系脂肪酸濃度と関連があるとの報告もなされている。¹⁰⁾ さらに、1 日あたり、2400–7200 mg の *n*-3 系脂肪酸の長期摂取によって、神経根障害、胸部出口症候群、頸部神経根症、手根管症候群及び熱症に伴う神経障害性疼痛が抑制される。¹¹⁾ さらに、Ozgocmen らは、高用量の *n*-3 系脂肪酸が線維筋痛症に有効であると報告している。¹²⁾ 以上の成績から、*n*-3 系脂肪酸の摂取は臨床においても炎症性疼痛並びに神経障害性疼痛に対して有効性が高いことが強く示唆される。

現在、疼痛制御を意識した *n*-3 系脂肪酸摂取に関するガイドラインは制定されていないが、米国精神医学会「*n*-3 系多価不飽和脂肪酸分科会」においては、「すべての成人は週に 2 回以上魚を食べること」とされ、わが国の厚生労働省の「食事摂取基準」でも、DHA・EPA を 1 日 1 g 以上摂取することが推奨されている。これらを考慮すると、*n*-3 系脂肪酸の疼痛制御に関する作用発現においては、推奨摂取量よりも高用量が必要であると考えられる。

DHA の抗侵害作用

DHA は、*n*-3 系脂肪酸の 1 つであり、炭素数 22、不飽和結合 6 個を有している。ヒト体内では DHA の生合成はほとんどなされず、また *n*-3 系及び *n*-6 系の相互変換もわずかであり、ヒト体内の DHA 量は、それらを含む食品の摂取量に反映している。生体内では主として中枢領域に存在し、特に、大脳皮質シナプス膜、網膜、神経などの膜リン脂質、特にホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリンに多く存在している。¹³⁾ また、心臓、精子及び母乳中にも含まれている。¹⁴⁾

これまでに DHA の疼痛制御機序として、1) アラキドン酸カスケードの抑制による抗炎症作用、¹⁵⁾ 2) 電位依存性ナトリウムチャネル阻害作用、¹⁶⁾ 3) カルシウムチャネルに対する阻害作用などが報告されている。^{16,17)} 筆者らもこれまでに DHA の抗侵害作用について検討を行ったところ、DHA が種々の異なる疼痛試験において、用量依存的な抗侵害作用を示し、¹⁸⁾ その抗侵害作用の発現機序の一部に、内因性のオピオイドペプチドの 1 つである β -エンドルフィンの遊離を介することを明らかにしている。¹⁹⁾ β -エンドルフィン視床下部の弓状核で産生される内因性オピオイドペプチドの 1 つであり、中枢神経系に作用することで強力な鎮痛作用を示すことが知られている。²⁰⁾ さらに、これらの可能性を支持する知見として、*n*-3 系 PUFA が血漿中の内因性オピオイドペプチド量を変化させることや、脂質の嗜好性に β -エンドルフィンが関するとの報告がある。²¹⁾

長鎖脂肪酸受容体 GPR40

近年、オーファン G-タンパク結合型受容体 (G protein-coupled receptor; GPCR) のリガンド探索研究により、ある種の脂肪酸が本受容体に結合することが明らかとなっている。特に、G protein-coupled receptor 40 (GPR40) は 7 回膜貫通型の G タンパク共役型受容体の 1 つであり、²²⁾ DHA や EPA のような長鎖脂肪酸によって活性化するとされている。長鎖脂肪酸の結合によって、phospholipase C やホスファチジルイノシトール経路が活性化され、細胞内カルシウム濃度の上昇を引き起こす。²²⁾ 末梢組織において GPR40 はインスリンなどの分泌調節を介して血糖値制御を担っていることが知られ、²³⁾ 現在注目されている受容体の 1 つである。一方、わ

われわれはマウスの中枢神経系における GPR40 の発現を確認している。さらに、ヒトやサル脳での存在も報告されており、PUFA-GPR40-CREB シグナル経路が神経新生や記憶に関与すると言われている。²⁴⁾

GPR40 を介した疼痛制御機構

われわれは、DHA の抗侵害作用機序を明らかにするために、脳内 GPR40 に焦点を当てた。まず、マウスの脳内における GPR40 のタンパク質発現を western blot 法を用いて検討したところ、大脳皮質、中脳、延髄、視床下部、海馬、嗅球、線条体及び小脳など、脳内各部位に幅広く発現することを確認した (Fig. 1).²⁵⁾ 特に、視床下部、中脳及び延髄においては、他の部位と比較して強い発現が認められた。²⁵⁾ 視床下部は β -エンドルフィンの産生部位であり、²⁰⁾ 中脳や延髄は疼痛制御において重要な領域²⁶⁾ であることから、これらの部位に発現している GPR40 は疼痛制御と密接に関連している可能性が示唆される。

さらに、GPR40 を介した疼痛制御機構の可能性について検討するために、GPR40 の選択的アゴニストである GW9508 (4-[(3-phenoxyphenyl) methyl] amino]-benzene propanoic acid) 又は DHA を用いてホルマリン試験を行った。ホルマリン試験は、ホルマリン投与直後から約 5 分間において認められる

early phase とホルマリン投与 10 分から 30 分後において認められる late phase の 2 相性の疼痛行動が観察される。この疼痛行動に対して、GW9508 (1.0 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) の脳室内投与は、early phase における疼痛行動への影響は認められなかったが、late phase においては有意に疼痛行動が減少した。同様に、DHA (50 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) の脳室内投与においても、late phase のみ疼痛行動が抑制された。したがって、これら両化合物の作用は GPR40 を介している可能性が示された (Fig. 2).²⁵⁾ さらに、DHA 及び GW 化合物による疼痛行動の抑制作用は、 μ , δ -オピオイド受容体拮抗薬や抗 β -エンドルフィン抗血清の前処置によって消失した。さらに、免疫組織学的検討から、DHA 及び GW9508 を脳室内投与すると、投与 10 分後から視床下部の弓状核領域において β -エンドルフィン陽性細胞数の増加が認められた (Fig. 3)。したがって、DHA による抗侵害作用の発現には脳内 GPR40 を介した β -エンドルフィンの遊離が関与している可能性が示され、脳内 GPR40 が疼痛制御機構において重要な役割をしていることが示唆された。

慢性疼痛時における GPR40 の関与

われわれは、蛍光二重免疫染色法によって、脳内 GPR40 がグリア細胞ではなく神経細胞上に発現していることを確認している。さらに、脳内 GPR40

Fig. 1. Expression of GPR40 and GPR120 in Tissue from the Brain, Spinal Cord and Intestine of Male ddY Mice
GAPDH was used as the internal control (a). Immunofluorescence imaging of GPR40 protein expression in the hypothalamus section (b). Scale bars=300 μm . (From Nakamoto *et al.*, 2012, reproduced by permission of Elsevier ref 25).

Fig. 2. Antinociceptive Effect of DHA or GW9508 on the Formalin Test

The early phase shows direct stimulation to primary afferent nerves, and the late phase shows indirect stimulation to primary afferent nerves caused by inflammatory substances (e.g., prostaglandins) in the formalin test. Data are mean $\pm$ S.E.M. [#] $p < 0.05$, compared with vehicle (one-way ANOVA and Dunnett's test). (a) i.c.v. injection of DHA (vehicle, $n=5$; DHA 25 μ g, $n=6$; DHA 50 μ g, $n=5$), (b) i.c.v. injection of GW9508 (vehicle, $n=8$; GW9508 0.1 μ g, $n=6$; GW9508 1.0 μ g, $n=10$). (From Nakamoto *et al.*, 2012, reproduced by permission of Elsevier ref 25).

のタンパク質発現は, complete Freund adjuvant (CFA) 誘発の炎症性疼痛下, 中脳, 延髄及び視床下部の領域で変動することから, 慢性疼痛の発現機序に GPR40 が一部関与する可能性が考えられる (未発表データ). これまでの検討において, DHA/GPR40 シグナルの活性化により, β -エンドルフィンが増加することから, おそらく GPR40 はこれらの前駆体であるプロオピオメランノコルチン(POMC)神経上に発現しており, 疼痛制御に関与している可能性が予想される. さらに, SH-SY5Y 細胞を用いた検討において, DHA はノルアドレナリンの放出を促進すること,²⁷⁾ n -3 系脂肪酸によってセロトニン作動性神経伝達物質が増加すること²⁸⁾などが報告されていることから, 下行性疼痛抑制神経上にも局在し, 内因性の疼痛制御機構に関係する神経の機能調節を担っていることが考えられる.

現在, われわれは GPR40 を介した疼痛制御機構として, 下記のような仮説を立てている. 疼痛が生じる急性期には, 延髄, 中脳及び視床下部などの疼痛関連領域において, 遊離脂肪酸 (GPR40 アゴニスト) の放出が増加することが予想される. 事実,

急性期の炎症において, DHA などの n -3 系脂肪酸は, 損傷部位へ集積し, 酵素的にレゾルビンやプロテクチンといった強力な抗炎症作用を示す生理活性物質へと代謝され, 炎症過程を収束させることが報告されている.²⁹⁾

一方で, 疼痛の維持期の段階のように, 持続的に痛みが続くと, 遊離脂肪酸は放出され続けるが, ある時点でこれら脂肪酸の放出が枯渇してくることが予想される. 興味深いことに, 神経障害性疼痛モデルマウスを用いた検討において, 神経障害後 7 日目の疼痛維持期の段階では, β -エンドルフィンの遊離が枯渇しているとの報告がある.³⁰⁾ これらの現象には, 脳内の遊離脂肪酸減少に伴う GPR40 を介したシグナル経路の破綻が関係しているのかもしれない.

脳内における遊離脂肪酸の供給先は, アストロサイト, 又は細胞膜上のホスホリパーゼ A₂ を介して切り出される場合が考えられている. 事実, 脳内の多価不飽和脂肪酸, 特に DHA やアラキドン酸はアストロサイトに発現している脂肪酸トランスポーター (CD36) を介して取り込まれ, 必要に応じて容易に放出され, 神経の機能を担っている³¹⁾ こと,

Fig. 3. Immunohistochemical Analysis for β -Endorphin Protein Expressions

Immunohistochemical study of β -endorphin was performed at time points (0, 10, 20 min) after DHA or GW9508 treatment. Scale bars=50 μ m. (From Nakamoto *et al.*, 2012, reproduced by permission of Elsevier ref 25).

アラキドン酸や DHA は Ca 依存性の細胞質型ホスホリパーゼ A₂(cPLA₂) や Ca 非依存性の細胞質型ホスホリパーゼ A₂(iPLA₂) によって、それぞれ加水分解をうけ、細胞膜から切り出される。³²⁾ 放出された遊離脂肪酸は、GPR40 シグナルを活性化させ、下行性疼痛抑制機構に関与するセロトニン神経、ノルアドレナリン神経あるいは β -エンドルフィンを含む POMC 神経等の生体内における疼痛制御機構を活性化させ、痛みを抑制する方向に働いているのかもしれない (Fig. 4)。さらに、GPR40 アゴニストの投与により、 β -エンドルフィンの遊離が促進されることから、中枢における GPR40 を介したシグナル機構は、末梢におけるインスリン分泌調節機構と類似して、オピオイドペプチドや神経伝達物質等の分泌調節にもなんらか関係しているのかもしれない。このようなことから、DHA を含む脳内遊離脂肪酸は GPR40 を介した疼痛制御機構のた

めのスイッチとしての役割を担っているとも考えられる。現在、これらの仮説を証明するために精力的に研究を進めている (Fig. 4)。

おわりに

脂肪酸が疼痛の惹起や制御において、重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。そのような状況の中で、本研究成果は脳内長鎖脂肪酸受容体 GPR40 を介した新たな疼痛制御機構の可能性について提唱した。現在、慢性疼痛に苦しんでいる患者数は 2000 万人以上とされており、新たな鎮痛薬の開発のために、慢性疼痛制御機構の解明に関する研究が急がれている。DHA を含む *n*-3 系 PUFA は、既に種々の生理・薬理作用に関して、幅広い観点からの研究がなされており、その安全性も確立していることから、様々な領域における臨床応用が期待される。脂肪酸あるいはその受容体をキーワードにして、難治性疼痛の発症機構の解明、それに対す

Fig. 4. Schematic Drawing of Possible Mechanisms Underlying GPR40 Mediated Antinociceptive Effect on Pain Stimuli

る新しい診断バイオマーカーの同定や個別化医療に貢献できる可能性が期待され、今後、本領域の研究が広く普及することを願う次第である。

謝辞 本研究は、科学研究費補助金の基盤研究(C) (研究課題番号：24592364) 及び武田科学振興財団の薬学系研究奨励からの助成を受けて遂行されたものである。

REFERENCES

- 1) Loh H. H., Law P. Y., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **20**, 201–234 (1980).
- 2) Bazan N. G., *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **10**, 136–141 (2007).
- 3) Mankura M., Kayama H., “AA, EPA, DHA-HUFA Polyunsaturated Fatty Acid,” ed. by Kayama H., Kouseisha Kouseikaku Co., Ltd., Tokyo, 1995.
- 4) Calder P. C., *Proc. Nutr. Soc.*, **67**, 409–418 (2008).
- 5) Belluzzi A., Boschi S., Brignola C., Munarini A., Cariani G., Miglio F., *Am. J. Clin. Nutr.*, **71**, 339S–342S (2000).
- 6) Bagga D., Wang L., Farias-Eisner R., Glaspy J. A., Reddy S. T., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 1751–1756 (2003).
- 7) Miyazawa D., Ikemoto A., Fujii Y., Okuyama H., *Life Sci.*, **73**, 2083–2090 (2003).
- 8) Lu Y., Zhao L. X., Cao D. L., Gao Y. J., *Neuroscience*, **241**, 22–31 (2013).
- 9) Woolf C. J., Salter M. W., *Science*, **288**, 1765–1768 (2000).
- 10) Goldberg R. J., Katz J., *Pain*, **129**, 210–223 (2007).
- 11) Ko G. D., Nowacki N. B., Arseneau L., Eitel M., Hum A., *Clin. J. Pain*, **26**, 168–172 (2010).
- 12) Ozgocmen S., Ozyurt H., Sogut S., Akyol O., *Rheumatol. Int.*, **26**, 585–597 (2006).
- 13) Tinoco J., *Prog. Lipid Res.*, **21**, 1–45 (1982).
- 14) Marszalek J. R., Lodish H. F., *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **21**, 633–657 (2005).
- 15) Gaudette D. C., Holub B. J., *Lipids*, **25**, 166–169 (1990).
- 16) Xiao Y. F., Kang J. X., Morgan J. P., Leaf A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 11000–11004 (1995).
- 17) Vreugdenhil M., Bruehl C., Voskuyl R. A., Kang J. X., Leaf A., Wadman W. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 12559–12563 (1996).
- 18) Nakamoto K., Nishinaka T., Mankura M., Fujita-Hamabe W., Tokuyama S., *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 1070–1072 (2010).
- 19) Nakamoto K., Nishinaka T., Ambo A.,

- Mankura M., Kasuya F., Tokuyama S., *Eur. J. Pharmacol.*, **666**, 100–104 (2011).
- 20) Bloom F., Battenberg E., Rossier J., Ling N., Guillemin R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 1591–1595 (1978).
- 21) Matsumura S., Eguchi A., Okafuji Y., Tatsu S., Mizushige T., Tsuzuki S., Inoue K., Fushiki T., *FEBS Lett.*, **586**, 1231–1235 (2012).
- 22) Briscoe C. P., Tadayyon M., Andrews J. L., Benson W. G., Chambers J. K., Eilert M. M., Ellis C., Elshourbagy N. A., Goetz A. S., Minnick D. T., Murdock P. R., Sauls H. R. Jr., Shabon U., Spinage L. D., Strum J. C., Szekeres P. G., Tan K. B., Way J. M., Ignar D. M., Wilson S., Muir A. I., *J. Biol. Chem.*, **278**, 11303–11311 (2003).
- 23) Itoh Y., Kawamata Y., Harada M., Kobayashi M., Fujii R., Fukusumi S., Ogi K., Hosoya M., Tanaka Y., Uejima H., Tanaka H., Maruyama M., Satoh R., Okubo S., Kizawa H., Komatsu H., Matsumura F., Noguchi Y., Shinohara T., Hinuma S., Fujisawa Y., Fujino M., *Nature*, **422**, 173–176 (2003).
- 24) Kaplamadzhiev D. B., Hisha H., Adachi Y., Ikehara S., Tonchev A. B., Boneva N. B., Pyko I. V., Kikuchi M., Nakaya M., Wakayama T., Iseki S., Yamashima T., *Biosci. Trends*, **4**, 119–129 (2010).
- 25) Nakamoto K., Nishinaka T., Matsumoto K., Kasuya F., Mankura M., Koyama Y., Tokuyama S., *Brain Res.*, **1432**, 74–83 (2012).
- 26) Basbaum A. I., Fields H. L., *Ann. Neurol.*, **4**, 451–462 (1978).
- 27) Mathieu G., Denis S., Langelier B., Denis I., Lavialle M., Vancassel S., *Neurochem. Int.*, **56**, 94–100 (2010).
- 28) Vines A., Delattre A. M., Lima M. M., Rodrigues L. S., Suchecki D., Machado R. B., Tufik S., Pereira S. I., Zanata S. M., Ferraz A. C., *Neuropharmacology*, **62**, 184–191 (2012).
- 29) Schwab J. M., Chiang N., Arita M., Serhan C. N., *Nature*, **447**, 869–874 (2007).
- 30) Niikura K., Narita M., Okutsu D., Tsurukawa Y., Nanjo K., Kurahashi K., Kobayashi Y., Suzuki T., *Neurosci. Lett.*, **433**, 54–58 (2008).
- 31) Moore S. A., *J. Mol. Neurosci.*, **16**, 195–200; discussion 215–221 (2001).
- 32) Kudo I., Murakami M., *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, **68–69**, 3–58 (2002).