



## Nagoya City University Academic Repository

学 位 の 種 類	博士（医学）
報 告 番 号	甲第1472号
学 位 記 番 号	第1058号
氏 名	渡辺 正哉
授 与 年 月 日	平成 27 年 3 月 25 日
学位論文の題名	<p>The role of TRPV1 channels in carrageenan-induced mechanical hyperalgesia in mice (カラゲナン誘導による疼痛モデルマウスにおける TRPV1 チャンネルの役割)</p> <p>Neuroreport. 2015 Feb 11;26(3):173-8</p>
論文審査担当者	<p>主査： 植木 孝俊 副査： 橋谷 光, 鵜川 眞也</p>

## 論文内容の要旨

### (背景・目的)

カプサイシン受容体として広く知られる transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) は痛覚伝導路の末梢 (痛覚刺激を受容する感覚神経であり侵害受容器と呼ばれる) および中枢 (脊髄以上のレベル) に発現する陽イオンチャネルであり、末梢における TRPV1 の活性化は、直接、痛覚を惹起する。また、内因性の炎症性発痛物質により TRPV1 の活性は増強されることから、疼痛過敏との関係も指摘されており、TRPV1 は鎮痛剤開発における重要な標的分子である。しかしながら、炎症性疼痛過敏の病態下で、機械性疼痛過敏の発症における TRPV1 の果たす役割については、一定の見解は得られていない。その原因として、疼痛過敏を評価する時間帯が限られており、長期に渡る経時的な観察が行われていないことが挙げられる。その他、TRPV1-KO (ノックアウト) を用いた実験では末梢と中枢の TRPV1 活性が消失するのに対して、拮抗薬を用いた実験では、投与部位に応じて、どちらか一方の TRPV1 しか阻害できていないことなども挙げられる。さらに、新規鎮痛剤の開発と相まって、TRPV1 阻害薬の応用研究が盛んであるが、帯状疱疹後の疼痛治療に用いられる高濃度 (8%) カプサイシンパッチのように、TRPV1 作動薬が疼痛の緩和に有効である場合もあり、その効果がどのような経路で発揮されるかについてもよくわかっていない。

そこで我々は、野生型マウスおよび TRPV1-KO マウスの足底にカラゲナン (起炎剤の一種) を皮下注射することにより炎症性疼痛過敏モデルを作出し、これらモデル動物における TRPV1 選択的拮抗薬と作動薬の温熱性・機械性疼痛過敏に対する効果を、経時的に調べた。

### (方法)

- 1) 野生型 C57BL/6J マウスおよび TRPV1-KO マウスの右足底にカラゲナンを皮下注射することで炎症性疼痛過敏モデル動物を作出し、以下の実験に用いた。
- 2) 機械性疼痛過敏は、足底部に von Frey filament によって機械刺激を加えることで評価した。同側と対側のそれぞれについて検討した。
- 3) TRPV1 選択的拮抗薬であるカプサゼピンの温熱性疼痛過敏に対する緩和効果を、マウスがホットプレート ( $55 \pm 1^\circ\text{C}$ ) に足底部を載せてから引込めるまでの時間を計測することで評価した。
- 4) カプサゼピンをカラゲナン投与の 30 分前 (事前投与) または 2 時間後 (事後投与) に末梢投与し、機械性疼痛過敏に対する緩和効果を von Frey test にて評価した。対照としてカプサイシン (作動薬) をカラゲナン投与の 2 時間後に末梢投与し、同様の方法で評価した。
- 5) データは mean  $\pm$  SEM で示し、two-way ANOVA post-hoc test にて有意差検定を行った。

### (結果)

- 1) カラゲナンを野生型マウスの右足底に注射すると、急性期 (10-60 分) から亜急性期 (1-2 日) にかけて、刺激側に一次性機械性疼痛過敏が、反対側に二次性機械性疼痛過敏が生じた。TRPV1-KO マウスでは、急性期における刺激側の機械性疼痛過敏が有意に減弱した。急性期および亜急性期における反対側の機械性疼痛過敏はほとんど生じなかった。
- 2) カプサゼピンを末梢に事前投与し、侵害受容器上に発現する TRPV1 の活性を抑制した場合も TRPV1-KO マウスと同様の結果が得られた。ただし、亜急性期における反対側の機械性疼痛過敏に対する疼痛緩和効果は認められなかった。

3) TRPV1 拮抗剤を実際に治療で用いる場合は事後での投与が想定されるため、カラゲナン投与の2時間後にカプサゼピンを末梢に投与した。その結果、カラゲナンは、温熱性疼痛過敏に対して抑制効果を示したが、機械性疼痛過敏に対しては無効であった。

4) TRPV1 作動薬のカプサイシンをカラゲナン処理2時間後に末梢投与した場合、刺激側のみならず反対側の機械性疼痛過敏も有意に抑制され、その効果は投与後2日経過した時点でも確認できた。この現象は TRPV1-KO マウスでは認められず、TRPV1 依存的であった。

(考察)

一次疼痛過敏は侵害受容器の感受性の亢進に起因し、二次疼痛過敏は脊髄後角に位置する侵害受容神経ネットワークの感受性の亢進によるものと考えられている。急性期における刺激側および反対側の機械性疼痛過敏は TRPV1-KO マウスにおいて減弱または消失したこと、および拮抗薬の事前処理（末梢投与）によっても同様の緩和効果が認められたことから、その発症には侵害受容器に発現する TRPV1 が関与していると考えられた。一方、亜急性期における反対側の機械性疼痛過敏は TRPV1-KO マウスでは認められなかったものの、拮抗薬の事前処理（末梢投与）では抑制されなかったことから、侵害受容器上に発現する TRPV1 ではなく中枢性の TRPV1 が発症に関わっていると考えられた。TRPV1 拮抗薬の影響を調べた実験では、カプサゼピンの事前投与が機械性疼痛過敏の緩和に有効であったのに対して、事後投与では効果を示さなかった。このことは、機械性疼痛過敏の治療には TRPV1 拮抗薬は不適応であることを意味している。対照的に、TRPV1 作動薬のカプサイシンは、事後投与でも強力かつ持続的な疼痛過敏抑制効果を示した。機械性疼痛過敏の治療においては、TRPV1 拮抗薬よりも作動薬の適用がより有効であると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

【背景、目的】TRPV1（カプサイシン受容体）は痛覚伝導路の末梢および中枢に発現する陽イオンチャネルであり、末梢におけるTRPV1の活性化は直接、痛覚を惹起する。また、内因性炎症性発痛物質によりTRPV1の活性は増強されることから、鎮痛剤開発における重要な標的分子である。しかしながら、炎症性疼痛過敏の病態下で、機械性疼痛過敏の発症におけるTRPV1の果たす役割については一定の見解は得られていない。さらに、TRPV1阻害薬による鎮痛薬への応用研究が盛んであるが、高濃度カプサイシンパッチのように作動薬が疼痛の緩和に有効である場合もある。そこで、野生型マウスおよびTRPV1-KOマウスの足底にカラゲナンを皮下注射することで炎症性疼痛過敏モデルを作出し、TRPV1選択的拮抗薬と作動薬の温熱性・機械性疼痛過敏に対する効果を経時的に調べた。

【方法】機械性疼痛過敏は von Frey テストによって同側と対側について評価した。TRPV1 選択的拮抗薬であるカプサゼピンの温熱性疼痛過敏緩和効果をホットプレートテストにて評価した。カプサゼピンをカラゲナン投与の 30 分前または 2 時間後に末梢投与し機械性疼痛過敏に対する緩和効果を評価した。対照としてカプサイシンを 2 時間後に投与し、同様に評価した。

【結果】野生型マウスの場合、急性期（10-60 分）から亜急性期（1-2 日）にかけて刺激側に一次性機械性疼痛過敏が、反対側に二次性機械性疼痛過敏が生じた。TRPV1-KO マウスでは、急性期における刺激側の機械性疼痛過敏が有意に減弱した。急性期および亜急性期における反対側の機械性疼痛過敏もほとんど生じなかった。カプサゼピンを事前投与し TRPV1 を抑制した場合も TRPV1-KO マウスと同様の結果が得られたが、亜急性期における反対側への疼痛緩和効果は認められなかった。TRPV1 拮抗剤を実際に治療で用いる場合を想定し、カラゲナン投与の 2 時間後にカプサゼピンを投与した。その結果、カプサゼピンは温熱性疼痛過敏に対して抑制効果を示したが、機械性疼痛過敏に対しては無効であった。カプサイシンをカラゲナン処理 2 時間後に末梢投与した場合、刺激側のみならず反対側の疼痛過敏も抑制され、その効果は投与 2 日後でも確認できた。この現象は TRPV1-KO マウスでは認められず TRPV1 依存的であった。

【考察】急性期における刺激側および反対側の機械性疼痛過敏は TRPV1-KO マウスにおいて減弱または消失し、拮抗薬の事前処理によっても同様の緩和効果が認められたことから、その発症には侵害受容器に発現する TRPV1 が関与していると考えられた。一方、亜急性期における反対側の機械性疼痛過敏は TRPV1-KO マウスでは認められなかったが、拮抗薬の事前処理では認められたことから中枢性の TRPV1 が発症に関わっていると考えられた。拮抗薬の事前投与が機械性疼痛過敏の緩和に有効であったのに対して、事後投与では効果を示さなかったことは機械性疼痛過敏の治療には拮抗薬は不適応であることを意味している。対照的に、作動薬は事後投与でも強力かつ持続的な疼痛過敏抑制効果を示し、薬物治療には有効であると考えられた。

【審査の内容】主査の植木教授より TRPV1 ブロッカーが亜急性期の反対側で効果がない理由について等、計 5 項目、第 1 副査の橋谷教授より TRPV1 の活性化因子と生理機能等について、19 項目、第 2 副査の鶴川教授より侵害受容器における機械受容体候補分子について等、4 項目の質問があった。これらの質問に対して申請者からはおおむね適切な回答が得られた。以上より学位論文の内容を十分に把握し、また大学院修了者としての学力を備えていると判断した。本研究は、痛覚受容体として広く知られている TRPV1 の炎症誘発による機械性痛覚過敏への関与と疼痛治療への有用性の一端を明らかにした研究であり、医学的にも高く評価される。よって、本論文著者は、博士（医学）の学位を授与するのに値するものと判定した。

論文審査担当者 主査 植木 孝俊

副査 橋谷 光、 鶴川 眞也