

しびれ動物モデルの確立とその分子メカニズムの解析

宗 可奈子

生体機能解析学分野

第1章 マウス後肢虚血/再灌流によるしびれモデルの確立

しびれは長時間の正座で誰しもが経験したことがある不快な感覚であり、異常感覚（錯感覚）と感覚鈍麻を伴う。臨床的には糖尿病性神経障害、閉塞性動脈疾患やがん化学療法時など様々な疾患や治療に頻繁に付随し、患者のQOLに与える影響が大きい。しかし、しびれ動物モデルは未だ確立されておらず、しびれ治療薬の開発はその糸口すら掴めていない。そこで本研究では、しびれ研究の端緒となるべく、正座後のしびれを模してマウス後肢に虚血/再灌流を施すことによるしびれマウスモデルの確立に挑んだ。さらに臨床モデルとしての妥当性を評価した。

マウス後肢虚血/再灌流処置として、左後肢をたこ糸で強く結紮、60分後、たこ糸を切断することで血流を再開させた。この時、後肢の血流量は結紮直後から顕著に低下し、たこ糸切断後、一過性に結紮前レベルより増加したが、約1時間後には結紮前の状態まで戻った。後肢虚血/再灌流後にマウスの自発行動を観察したところ、再灌流直後から約10分間、処置側において激しい自発的なlicking（舐め行動）が観察され、その後、40分後まで漸減しつつ持続した。再灌流後40分間の累積licking時間は後肢虚血時間（15～60分間）に依存し、いずれもsham処置群と比較して有意な差が認められた。一方、後肢虚血中および再灌流後の足底触刺激に対する応答をvon Freyフィラメントおよび絵筆を用いて測定したところ、虚血中はいずれも触刺激に対する鈍麻が認められた。また、

30～60 分間の後肢虚血負荷により、再灌流後も約 15～60 分間持続する触覚鈍麻が観察された。さらに、周波数の違いにより C/A δ /A β 線維を個別に刺激できる電流知覚閾値検査装置を用いて各神経線維刺激時の反応を観察したところ、いずれの神経線維も虚血負荷中から再灌流数十分後にかけて、電流知覚閾値の上昇（感覚鈍麻）が認められたが、その回復は C 線維 > A δ 線維 > A β 線維の順に早く、特に A β 線維は虚血負荷に対する影響が大きいことが示された。次に後肢虚血/再灌流後の licking に対して、各種鎮痛薬の効果を検討したところ、オピオイド（モルヒネ、トラマドール）、Ca²⁺チャンネル $\alpha_2\delta$ サブユニットリガンドのガバペンチン、三環系抗うつ薬アミトリプチリン、Na⁺チャンネル阻害薬メキシレチンは有意な抑制作用を示したが、NSAID であるジクロフェナクは抑制作用を示さなかった。

以上本章において、筆者はマウス後肢虚血/再灌流によりしびれモデルを確立した。さらに虚血/再灌流時は自発的 licking 行動と触覚鈍麻が併発することを明らかにした。正座後のしびれでは、激しい痛みと触覚鈍麻が併発することを経験するが、これは既存の疼痛動物モデルでは報告されておらず、本モデルは痛みの側面の強いしびれ行動を表現した初の動物モデルであると考えられる。さらにこの自発的 licking 行動はモルヒネ、トラマドール、ガバペンチン、メキシレチン、アミトリプチリンにより抑制されることを明らかにした。

第2章 虚血/再灌流によるしびれの分子メカニズム

第1章で筆者はマウス後肢/虚血再灌流によりしびれモデルの確立をおこなった。そこで次にその分子メカニズムについて解析を行った。そこで次に虚血/再灌流時に付随して発生する刺激で活性化する transient receptor potential (TRP) A1 チャネルの関与を検討し、その分子メカニズムの解析を行った。

後肢虚血/再灌流によるしびれのメカニズムとして、虚血/再灌流後に大量に発生する ROS の関与を検討したところ、虚血/再灌流処置を行った後肢において、再灌流 5 分後に無処置側後肢と比較して ROS の一つである H_2O_2 の産生が増大していた。さらに ROS スカベンジャーの投与により虚血/再灌流後の自発的 licking は有意に抑制された。そこで ROS により活性化される一次感覚神経の侵害受容器 TRPA1 に着目した検討を行った。すると、TRPA1 阻害薬 HC030031 の投与あるいは TRPA1 遺伝子欠損 (TRPA1-KO) マウスでは虚血/再灌流後の licking がいずれも有意に抑制されたが、触刺激に対する鈍麻に影響は見られなかった。ROS による TRPA1 の活性化メカニズムを明らかにするため、ヒト TRPA1 (hTRPA1) を発現させた HEK293 細胞を用いて Ca^{2+} イメージング法による検討を行った。通常の酸素濃度下 (160 mmHg) で低濃度 H_2O_2 (10 μM) を処置しても細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) にはわずかな上昇が認められるに過ぎないが、30 分間の低酸素 (100-80 mmHg) 負荷後、再酸素化と同時に H_2O_2 を処置すると、hTRPA1 の開口による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が低酸素濃度依存的に有意に増強した。同様に、単離したマウス後根神経節 (DRG) 細胞でも 30 分間の低酸素負荷により H_2O_2 誘発 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 応答が有意に増強されたが、TRPA1-KO マウスから単離した DRG 細胞では、低酸素負荷後の H_2O_2 応答が観察されなかった。また、TRPA1 が低酸素センサーとして働くために必要なプロリン水酸化酵素 (PHD) の修飾部位である Pro³⁹⁴ をアラニンに置換した hTRPA1 変異体を発現させた細胞では低酸素負荷後の H_2O_2 応答が消失した。加えて、野生型 hTRPA1 と共に PHD 機能欠損型変

異体を過剰発現させた細胞でも低酸素負荷後の H_2O_2 応答が消失した。さらに *in vivo* において、PHD 抑制薬 dimethyloxaloylglycine をマウス足底内に前処置しておくこと、 H_2O_2 足底内注射による疼痛行動が有意に増強され、これは TRPA1 阻害薬により抑制された。

以上、本章において筆者は、後肢虚血再灌流によって誘発される自発的 licking 行動において、ROS と TRPA1 が関与することを明らかにした。さらにそのメカニズムとして低酸素により TRPA1 が ROS に対する感作をおこすこと、さらにその感作には低酸素により活性化が低下する PHD と PHD により水酸化修飾をうける TRPA1 Pro³⁹⁴ が関与することを明らかにした。

以上、本研究の成果は、初のしびれモデルの確立と、今まで解明されていなかったしびれ発生機序の一部を明らかにしたものであり、臨床上問題となるしびれの対処法・治療薬の開発に向けての重要な知見となる。