

(続紙 1)

京都大学	博士 (薬学)	氏名	宗 可奈子
論文題目	しびれ動物モデルの確立とその分子メカニズムの解析		
(論文内容の要旨)			
<p>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するとともに、治療標的候補として低酸素や高酸素あるいは活性酸素種 (ROS) など虚血/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。</p>			
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			
<p>マウス後肢虚血/再灌流処置として、左後肢をたこ糸で堅く結紮、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/Aδ/Aβ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>Aδ線維>Aβ線維の順に早く、特にAβ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⁺チャネルα₂δ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。以上の結果から、マウス後肢の虚血/再灌流により鎮痛薬で抑制され</p>			

る自発的licking行動と触覚鈍麻が併発することが明らかとなった。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。

第2章 虚血/再灌流によるしびれの分子メカニズム

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、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Ca²⁺イメージング法による検討を行った。通常酸素濃度下 (160 mmHg) で低濃度H₂O₂ (10 μM) を処置しても細胞内Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_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H₂O₂を処置すると、hTRPA1の開口による[Ca²⁺]_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H₂O₂誘発[Ca²⁺]_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H₂O₂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H₂O₂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H₂O₂応答が消失した。さらにin vivoにおいて、PHD抑制薬dimethylloxaloylglycineをマウス足底内に前処置しておくこと、H₂O₂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。以上の結果から、低酸素負荷によりPHD活性が低下することでTRPA1 Pro³⁹⁴の脱水酸化が生じ、その後の再灌流時にTRPA1のROS感受性が増大することが示唆される。

以上、本研究においてマウス後肢虚血/再灌流により触覚鈍麻と自発的しびれ行動が併発する動物モデルを確立した。そのメカニズムとして、後肢虚血時の低酸素負荷によりPHD抑制を介してTRPA1のROS感受性が増大すること、さらに再灌流時に発生したROSが過敏化したTRPA1を強く活性化することにより自発的しびれ行動が惹起されることを見出した。これらの成果は、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。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

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するとともに、治療標的候補として低酸素や高酸素あるいは活性酸素種(ROS)など虚血/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が行われた。

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

著者は、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した60分後、たこ糸を切断することで血流を再開させる簡便なモデルを考案した。すると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に戻った。一方、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。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。さらに後肢虚血/再灌流後のlickingに対する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。

以上の結果から、マウス後肢の虚血/再灌流により鎮痛薬で抑制される自発的licking行動と触覚鈍麻が併発することが明らかとなった。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著者は結論づけた。

第2章 虚血/再灌流によるしびれの分子メカニズム

著者は、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。まず、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ところ、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HEK細胞を用いてCa²⁺イメージング法による検討を行った。通常酸素濃度下（160 mmHg）で低濃度H₂O₂（10 μM）を処置しても細胞内Ca²⁺濃度（[Ca²⁺]_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H₂O₂を処置すると、hTRPA1の開口による[Ca²⁺]_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H₂O₂誘発[Ca²⁺]_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H₂O₂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H₂O₂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H₂O₂応答が消失した。さらにin vivoにおいて、PHD抑制薬dimethylxaloyl glycineをマウス足底内に前処置しておくこと、H₂O₂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。

これらの結果から、低酸素負荷によりPHD活性が低下することでTRPA1 Pro³⁹⁴の脱水酸化が生じ、再灌流時にTRPA1のROS感受性が増大することが示唆された。

以上、本研究においてマウス後肢虚血/再灌流により触覚鈍麻と自発的しびれ行動が併発する動物モデルが確立された。そのメカニズムとして、後肢虚血時の低酸素負荷によりPHD抑制を介してTRPA1のROS感受性が増大すること、さらに再灌流時に発生したROSが過敏化したTRPA1を強く活性化することにより自発的しびれ行動が惹起されることを見出した。これらの成果は、世界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。

よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成28年2月26日、論文内容とそれに関連した事項について諮問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当分の間、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。