

しびれ動物モデルの確立と
その分子メカニズムの解析

2015

宗 可奈子

謹呈

拙書ではございますが、御一読頂ければ幸いに存じます。
今後とも御指導、御鞭撻を賜りますようお願い申し上げます。

平成28年3月23日

宗 可奈子

しびれ動物モデルの確立と
その分子メカニズムの解析

2015

宗 可奈子

目次

緒言	1
第一章 マウス後肢虚血/再灌流によるしびれモデルの確立	4
実験方法	6
実験結果	
第一節 後肢虚血/再灌流中のマウス後肢における血流変化.....	9
第二節 後肢虚血/再灌流による機械刺激感受性の変化.....	10
第三節 後肢虚血/再灌流による電気刺激に対する感受性の変化	12
第四節 後肢虚血/再灌流による自発行動	13
第五節 後肢虚血/再灌流誘発 licking 行動に対する各種鎮痛薬の効果	17
考察	19
第二章 虚血/再灌流によるしびれの分子メカニズム	22
実験方法	24
実験結果	
第一節 後肢虚血/再灌流誘発 licking 行動における ROS の関与.....	29
第二節 後肢虚血/再灌流誘発 licking 行動における TRPA1 の関与	32
第三節 急激な低酸素負荷による TRPA1 の活性化	36
第四節 低酸素負荷による H ₂ O ₂ 誘発 TRPA1 活性化の増強	38
第五節 H ₂ O ₂ に対する低酸素誘発 TRPA1 感作における PHD と TRPA1-N 末端プロ リン残基の関与	44
第六節 PHD 抑制による TRPA1 を介した H ₂ O ₂ 誘発逃避行動の増強.....	46
考察	47
総括および結論	51
謝辞	53
発表論文目録.....	54
参考文献	55

緒言

しびれは長時間の正座など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）や感覚鈍麻を伴う（1,2）。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 に与える影響も大きい（3-7）。しかし、そのメカニズムの多くは未だ解明されておらず、治療法や治療薬の確立にも至っていない。この最も大きな原因としてしびれ動物モデルが未だ確立されていないことが挙げられる。そこで本研究では、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り、マウスしびれモデルを確立した。さらに様々な行動学的変化を解析することでしびれモデルとしての妥当性を評価するとともに、そのメカニズム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 チャン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。以下新知見を二章に分けて報告する。

第一章では、マウスの後肢をたこ糸で結紮しその後結紮をほどくことで虚血/再灌流処置を施し、しびれモデルを作成した。そしてこのモデルにおいて行動学的変化を解析した。その結果、後肢を結紮すると虚血中から機械刺激に対する触覚鈍麻が発生し、また電気刺激に対する電流知覚閾値が C 線維、A δ 線維、A β 線維のいずれにおいても上昇することを明らかにした。さらに再灌流の直後からは処置側に対する自発的 licking 行動が惹起され、この自発的 licking 行動は、臨床で用いられるいくつかの鎮痛薬により抑制され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

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。

第二章では虚血/再灌流によるしびれのメカニズムについて解析を行った。その結果、虚血/再灌流後の自発的 licking 行動には、虚血/再灌流により発生した活性酸素種 (ROS) と、一次感覚神経の侵害受容器であり ROS により活性化される TRPA1 (21-28) が関与し、触刺激に対する鈍麻には TRPA1 が関与しないことを明らかにした。さらにヒト TRPA1 (hTRPA1) を発現させた HEK293 細胞と単離マウス後根神経節 (DRG) 細胞において、低酸素負荷をかけることにより、通常酸素時と比較して ROS の一種である H_2O_2 による $[Ca^{2+}]_i$ 応答が増強、つまり低酸素により H_2O_2 に対して TRPA1 が感作すること、そしてこのメカニズムとして、低酸素で活性が低下することが知られているプロリン水酸化酵素 (PHD) (26) と、TRPA1 においてプロリン水酸化酵素 (PHD) の修飾部位である 394 番目のプロリン残基 (26) が関与することを明らかにした。さらに PHD 抑制薬 dimethyloxallylglycine (DMOG) を用いることで、この TRPA1 の H_2O_2 に対する感作がマウスの行動においても再現できることを明らかにした。

これらの研究成果について以下に論述する。

なお、本文中で使用した略語は以下の通りである。

AITC	allyl isothiocyanate
ANOVA	analysis of variance
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMOG	dimethyloxallylglycine

DMSO	dimethyl sulfoxide
DRG	dorsal root ganglia
FBS	fetal bovine serum
Fura 2-AM	Fura 2-acetoxymethylester
H ₂ O ₂	hydrogen peroxide
HEK293	human embryonic kidney 293
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
KO	knockout
NSAID	non-steroidal antiinflammatory drug
PBN	<i>N-tert</i> -Butyl- α -phenylnitrone
PBS	Phosphate buffered solution
PHD	Prolyl hydroxylases
PO ₂	oxygen partial pressure
ROS	reactive oxygen species
RNS	reactive nitrogen species
TEMPOL	1-Oxyl-2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine
TRP	transient receptor potential
TRPA1	transient receptor potential ankyrin 1
TRPM8	transient receptor potential melastatin 8
TRPV1	transient receptor potential vanilloid 1
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
i.p.	intraperitoneal
i.pl.	intraplantar
WT	wild type

第一章

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

しびれは一般的に、自発的に生じるもしくは外的刺激により惹起される、チクタク、ピリピリ、ビリビリ、といった不快な感覚である。またしばしば、痛みや錯感覚（異常感覚）、感覚の鈍麻や消失を伴う(1,2)。しびれは、様々な疾患や治療に付随する。例えば糖尿病性末梢神経障害、末梢絞扼性ニューロパチー、多発性神経炎、末梢動脈疾患、抗がん剤誘発末梢神経障害などが挙げられ、臨床において多くの問題を引き起こす(3-7)。しかし現在、しびれの治療薬は開発されていない。その最も大きな理由として動物において適切なしびれモデルが開発されておらず、そのためにしびれの分子メカニズムの大半が解明されていないことがあげられる。このため、しびれモデルの開発が強く求められている。

しびれは一次感覚神経の構造的もしくは機能的な障害により発生する。後者の場合、末梢動脈疾患による血管障害により、早期の段階で冷感やしびれ、感覚鈍麻が発生する。そして疾患の進行に伴い四肢の痛みが増強してくる(3,8,10)。この臨床所見は感覚神経周囲の低酸素状態がしびれの原因となることを示唆している。また日常生活においても長時間の正座などにより虚血状態になり、その後正座を崩すことで血流が再開、つまり再灌流が起こった際に触刺激に対する感覚鈍麻と激しい痛みを伴うしびれを経験する。

これらのことから、ヒトにおいてしびれが惹起される正座を模した虚血/再灌流をマウスに施すことでマウスにおいてもしびれを惹起できるのではないかと考えた。そこでマウスの後肢をたこ糸で結紮し、その結紮を解くことで虚血/再灌流を施ししびれモデルの確立を行った。さらにこのマウス後肢虚血/再灌流によるしびれモデルにおいて、機械刺激や電気刺激に対する感受性や、自発行動観察などにおいて行動学的評価を行い、また既存の鎮痛薬に対する効果について検討した。

実験方法

1) 実験動物

実験には雄性の ICR 系マウス (生後 6-7 週齢 ; 日本 SLC, 静岡) を使用した。全ての動物は室温が $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、明暗周期が 12 時間の室内で飼育し、餌および水は自由に摂取させた。実験は全て京都大学動物実験委員会による審査・承認を受け、「動物実験に関する日本薬理学会指針」を遵守して行われた。

2) 使用薬物

モルヒネ塩酸塩は武田薬品工業 (大阪) より、アミトリプチリン塩酸塩は LKT Laboratories (MN, USA) より、トラマドール塩酸塩とガバペンチンは和光純薬工業 (大阪) よりジクロフェナクナトリウムとメキシレチンは Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) より購入した。

3) 後肢虚血/再灌流によるしびれモデルの作成

マウス左後肢足首を吸入麻酔下、たこ糸 (No. 20; Pocket, Sanda, 日本) で強く結紮し虚血処置とした。同時にたこ糸を切断から保護するためマウス腹部にエリザベスカラー (Lomir Biomedical Inc., Malone, NY) を装着した。そして血流測定以外の場合は観察用アクリルチャンバーに入れ吸入麻酔下から回復させた。後肢結紮開始から 15-60 分後、覚醒下で素早くたこ糸をほどき再灌流とした。

4) 後肢血流の測定

ペントバルビタール (64.8 mg/kg, i.p.) 麻酔下、無処置側、虚血処置側、両側

の足底を laser speckle blood flow analyzing system (OMEGA ZONE, Omega wave Co., Tokyo, Japan) により測定した。データは照明および温度による変化を考慮し虚血処置側を反対側の無処置群で平均化し表した。

5) 後肢虚血/再灌流による自発的licking行動の測定

マウスは後肢の再灌流開始1時間前から観察用アクリルチャンバー(直径, 30 cm; 高さ, 50 cm) に馴化させた。後肢虚血/再灌流後、チャンバー中央にマウスを置き自発行動を観察した。自発的licking行動は、再灌流後5分ごとの合計時間を再灌流後60分まで、あるいは再灌流後40分までの合計時間を測定した。

6) 機械刺激感受性の測定

マウスは後肢虚血/再灌流処置の少なくとも30分前に測定用チャンバー(直径, 7.5 cm; 高さ, 10 cm) に馴化させた。静的機械刺激に対する感受性は1gのvon Frey filament (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) を用いて、マウス足底中央部に圧刺激を加え評価した。動的刺激に対する感受性は絵筆(Φ, 10 mm; Pentel, Tokyo, Japan) を用い足の甲部分を撫でることで評価した。マウスの逃避行動はスコア: 0, 反応なし; 1, 足をずらす、舐めるなどの穏やかな反応; 2, 跳ねる、足を振るなどの激しい反応、により評価した。1回の測定で3-4秒ごとに5回の刺激を行い、それぞれの刺激に対する反応をスコアにより評価し、5回の刺激の合計スコア(0-10)を機械刺激に対する感受性とした。

7) 電気刺激に対する感受性の測定

マウスを測定用シリンダー(直径, 3 cm; 長さ, 10 cm) に保定し、30分馴化させた後測定を開始した。測定はマニュアルモードで測定した。5Hz、250Hz、

2000Hz、においてそれぞれ0mAから測定を開始し、徐々に電流を上昇させ足を振るなどの逃避行動を起こしたところで電気刺激を停止させた。その時の測定値から5Hz、250Hz、2000Hzそれぞれの電流を上下させ、その反応閾値を決定した。

8) 統計解析

値は全て、平均値±標準誤差で標記した。二群間の差はStudent's *t*-testにより、三群以上の差は、one-wayあるいはtwo-way ANOVAおよびBonferroni *post hoc* testにより解析した。 $P < 0.05$ の差を有意であると見なした。

結果

第一節 後肢虚血/再灌流中のマウス後肢における血流変化

はじめに後肢虚血/再灌流による後肢の変化を観察し、後肢の結紮中（虚血）と結紮を解いた後（再灌流）の血流を測定した。虚血中、結紮処置側後肢はチアノーゼが、再灌流直後には赤発と腫脹が観察された（図 1-1 a）。この時の血流を無処置側後肢と比較すると、結紮処置側後肢では虚血中は約 25%まで血流が低下した。さらに再灌流直後には一時的に増加したが、徐々に低下し、再灌流 60 分後には虚血処置前の状態まで戻った（図 1-1b）。

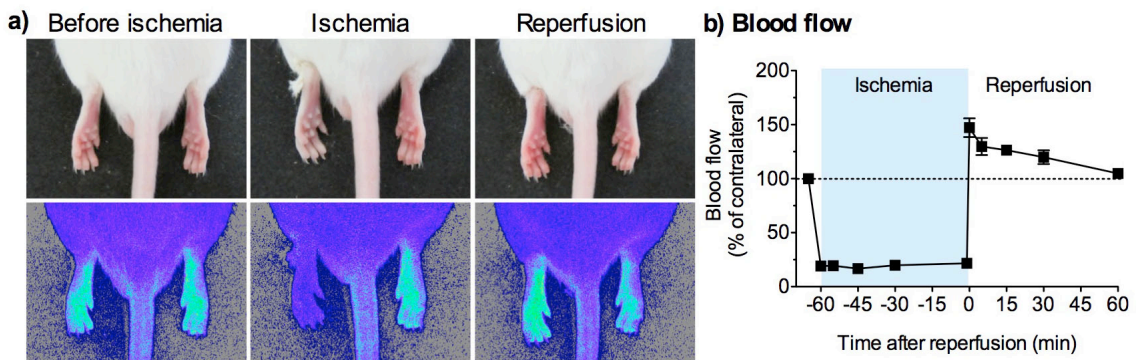


図 1-1 虚血/再灌流による後肢血流の変化

後肢虚血/再灌流処置は、マウス左足首部分をたこ糸により 60 分間結紮することで虚血処置とし、その後結紮を解くことで再灌流処置とした。(a) 虚血前、虚血中、再灌流後のマウス後肢の状態を示した画像（上段）と、その時の血流を表した blood flow image（下段）。(b) 処置側の血流は無処置側により平均化し、虚血前の状態は 100%として表した。 $n = 3$

第二節 後肢虚血/再灌流による機械刺激感受性の変化

後肢虚血/再灌流が触覚にどのような影響を与えるか検討するために、von Frey filament と絵筆による brushing により、機械刺激に対する感受性を評価した (図 1-2)。

Von Frey filament において、虚血/再灌流処置をしていない反対側後肢では、虚血中のみ後肢逃避反応のスコアが減少する傾向がみられた。また、虚血処置側後肢では、15分 ($F_{1,10} = 7.24, p < 0.05$)、30分 ($F_{1,10} = 20.1, p < 0.01$)、60分 ($F_{1,10} = 37.5, p < 0.001$) の虚血処置により、虚血中の後肢逃避反応のスコアが有意に減少した。虚血処置 15 分のマウスにおいては、虚血中に減少したスコアが再灌流直後に反対側と同じスコアまで戻った。一方、虚血処置 30 分と 60 分のマウスにおいては、それぞれ再灌流 15 分、60 分後まで反対側と比較して有意なスコアの減少が持続しており、これは徐々に虚血前の状態まで戻った。同様に、絵筆によるブラッシングにおいても後肢の 60 分間の虚血と再灌流により後肢逃避反応のスコアがみられ ($F_{1,10} = 76.5, p < 0.001$)、これは再灌流 30 分後まで持続した。

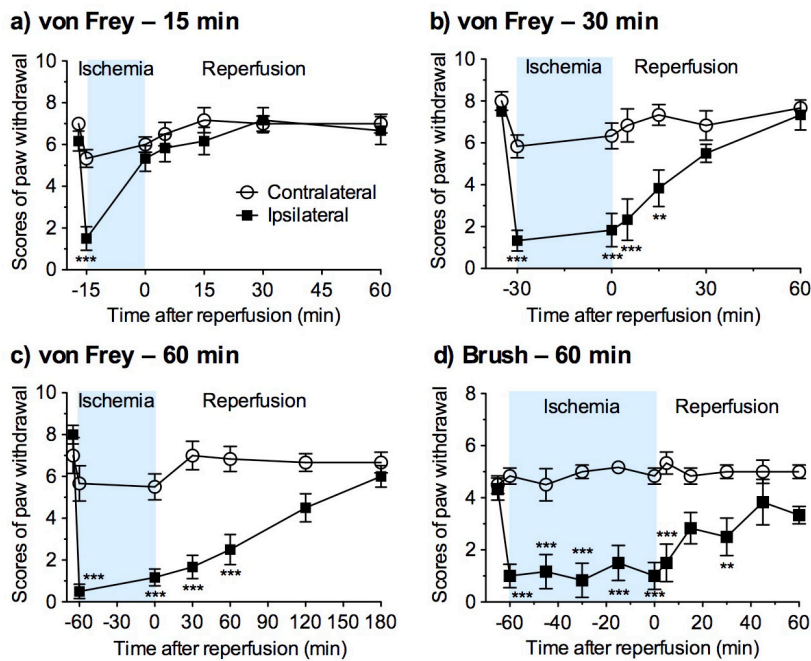


図 1-2 後肢虚血/再灌流の機械刺激感受性への影響

(a-c) von Frey filamentによる静的機械刺激に対する感受性は虚血直前、15分 (a)、30分 (b)、60分 (c) 虚血中、再灌流後に測定した。(d) 絵筆を用いたブラッシングによる動的機械刺激に対する感受性は虚血直前、60分虚血中、再灌流後に測定した。無処置側および処置側後肢の機械刺激に対する逃避反応は、実験方法の機械刺激感受性の測定において述べた方法でスコア化した。 $n = 6$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. contralateral.

第三節 後肢虚血/再灌流による電気刺激に対する感受性の変化

後肢虚血/再灌流時の電気刺激に対する感受性の変化についてニューロメーターを用いて検討を行った。虚血後から 5HZ (c-fiber) 、 250HZ (A δ -fiber) 、 2000HZ (A β -fiber) 電気刺激に対する閾値の上昇が観察され、再灌流後は上昇した閾値が徐々に低下した。5HZ (c-fiber) 、 250HZ (A δ -fiber) では再灌流後約 60 分後には虚血前の閾値まで戻ったが、2000HZ (A β -fiber) では再灌流後 60 分においても、閾値の上昇が持続していた (図 1-3 a,b,c)。

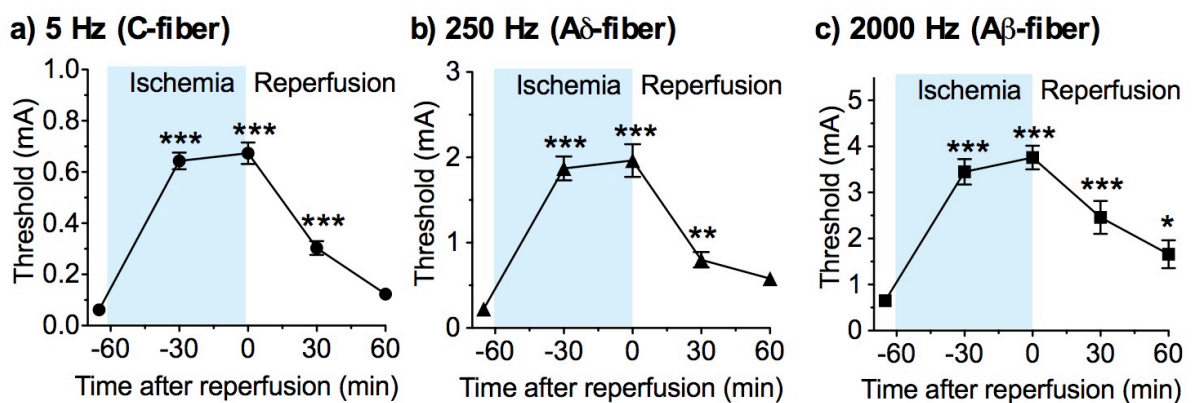


図 1-3 後肢虚血/再灌流中の電気刺激に対する反応閾値の上昇

(a-c) ニューロメーターによる電気刺激に対する反応閾値は虚血直前、虚血処置後30分、60分、再灌流後30分、60分において測定した。それぞれc-fiber (a) は5 HZ で、A δ -fiber (b) は250 HZ で、A β -fiber (c) は200 HZ で 刺激を行った。 $n = 6$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. before ischemia.

第四節 後肢虚血/再灌流による自発行動

後肢虚血/再灌流により惹起される自発行動について、後肢虚血の後、結紮を解き再灌流を行うと、直後から処置側に対する licking 行動が観察された。しかし、flicking などの行動はほとんど観察されなかった (図 1-4)。60 分の虚血処置を行ったマウスにおいて、再灌流後この自発的 licking 行動を呈した時間を 1 分ごとに 20 分間記録したところ、有意に増加していた ($F_{1,11} = 95.4, p < 0.001$)。この増加は sham 処置群と比較して再灌流 2-7 分後において観察され、再灌流 5 分後にはピークに達した (図 1-5 a)。また、虚血処置 15 分、30 分、60 分のマウスにおいて、再灌流後自発的 licking 行動を呈した時間を 5 分ごとに 40 分間記録したところ、sham 処置群と比較して再灌流 5 分後および 10 分後において有意に増加していた ($F_{3,29} = 58.6, p < 0.001$)。しかし、虚血処置 15 分、30 分のマウスにおいて、自発的 licking 行動の増加は再灌流後 15-20 分で消失したのに対し、虚血処置 60 分のマウスにおいては、再灌流後 40 分までに再度わずかに上昇した (図 1-5 b)。さらに再灌流後 40 分までの自発的 licking 行動を呈した合計時間は有意に増加しており、それは虚血処置の長さに依存していた (図 1-5 c; $F_{3,29} = 21.4, p < 0.001$)。また再灌流後 0-10 分を early phases、10-40 分を delayed phases として解析したところ、early phases においては虚血処置 15 分、30 分、60 分どのマウスにおいても有意に自発的 licking 行動が増加していたが ($F_{3,29} = 18.2, p < 0.001$)、delayed phases においては虚血処置 60 分のマウスでのみ有意に自発的 licking 行動が増加しており、虚血処置 15 分と 30 分のマウスでは増加していなかった (図 1-6; $F_{3,29} = 6.23, p < 0.01$)。

以降の検討においては、虚血/再灌流後最も機械刺激に対する触覚鈍麻が持続

し、自発的 licking 行動において delayed phases に licking が増加する虚血処置
60 分を選択した。

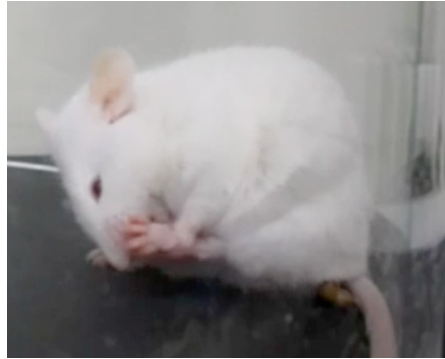


図 1-4 後肢虚血/再灌流後の自発行動

後肢虚血/再灌流後から処置側に対する licking 行動が惹起された。

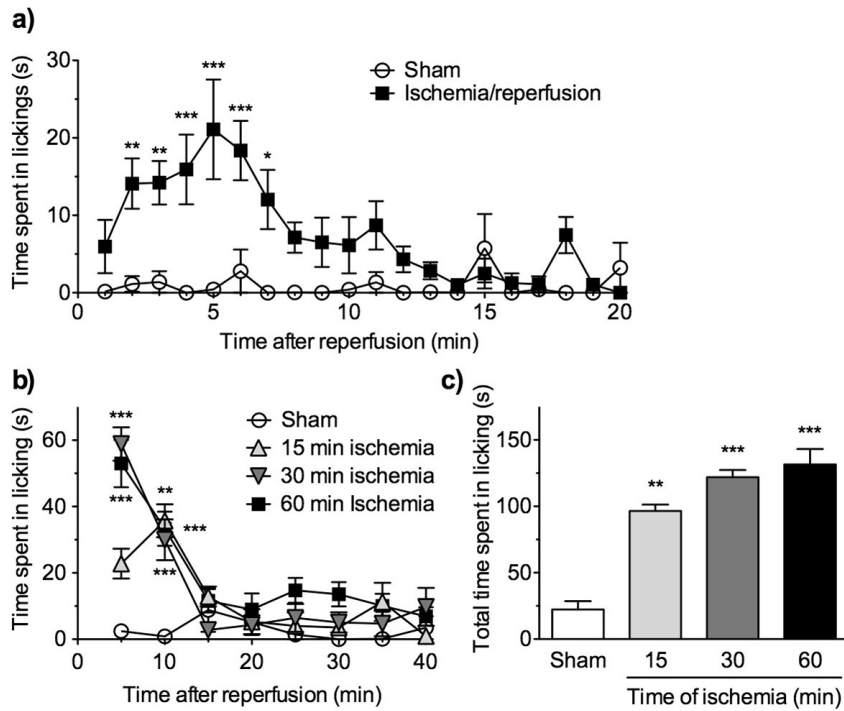


図 1-5 後肢虚血/再灌流後の自発的 licking 行動

虚血 15 分、30 分、60 分における再灌流後の自発的 liking 行動の経時的変化

(a) 虚血 60 分 (n = 7) と sham 処置 (n = 6) における再灌流後 20 分までの 1 分ごとの処置側後肢に対する licking 時間。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs sham treatment.

(b,c) 虚血 15 分、30 分、60 分と sham 処置における再灌流後 40 分までの 5 分ごとの処置側後肢に対する licking 時間 (b) と、再灌流後 40 分までの licking 合計時間 (c)。n = 4–15, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs sham treatment.

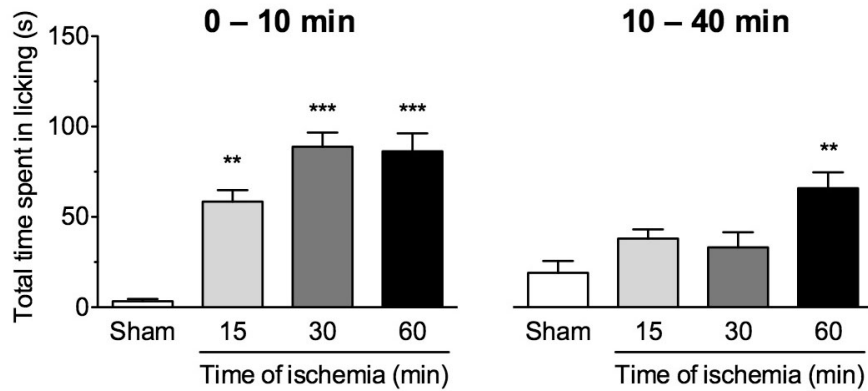


図 1-6 長時間の後肢虚血は再灌流後に2層性の自発的licking行動を惹起する虚血/再灌流後の自発的lickig行動を呈した合計時間を、early phases (再灌流後0-10分；左)、delayed phases (再灌流後10-40分；右)に分け解析した。 $n = 4-15$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs sham treatment.

第五節 後肢虚血/再灌流誘発 licking 行動に対する各種鎮痛薬の効果

後肢虚血/再灌流により惹起される licking 行動に対する、臨床で用いられる鎮痛薬である、抗炎症薬 (NSAID; ジクロフェナク)、オピオイド (モルヒネ、トラマドール)、三環系抗うつ薬 (アミトリプチリン)、電位依存性 Ca^{2+} チャネル $\alpha_2\delta$ リガンド (ガバペンチン)、電位依存性 Na^+ チャネルブロッカー (メキシレチン) の効果について検討した (図 1-7)。

再灌流 30 分前における、モルヒネ (1, 3 and 5 mg/kg)、トラマドール (10, 30 mg/kg)、アミトリプチリン (5 and 10 mg/kg)、ガバペンチン (10 and 30 mg/kg)、メキシレチン (10 and 30 mg/kg) の i.p.投与は、licking を呈する時間を投与量依存的に有意に減少させた (モルヒネ; $F_{3,18} = 19.4$, $p < 0.001$, トラマドール; $F_{2,22} = 4.75$, $p < 0.05$, アミトリプチリン; $F_{2,15} = 9.33$, $p < 0.01$, ガバペンチン; $F_{2,15} = 3.86$, $p < 0.05$, メキシレチン; $F_{2,16} = 67.1$, $p < 0.001$)。モルヒネ (3, 5 mg/kg)、トラマドール (30 mg/kg)、アミトリプチリン (10 mg/kg)、ガバペンチン (30 mg/kg)、メキシレチン (10, 30 mg/kg) において saline 投与群と比較して有意な減少効果がみられたが、ガバペンチンにおいてはその効果は弱かった。一方ジクロフェナク (25, 50 mg/kg) においては有意な効果は無かった ($F_{2,15} = 2.70$, $p = 0.099$)。sham 処置群においてはジクロフェナク (50 mg/kg)、モルヒネ (5 mg/kg)、トラマドール (30 mg/kg) ガバペンチン (30 mg/kg) では licking 行動を呈する時間に変化は見られなかったが、アミトリプチリン (10 mg/kg) と メキシレチン (30 mg/kg) では licking 行動を呈する時間が減少した。

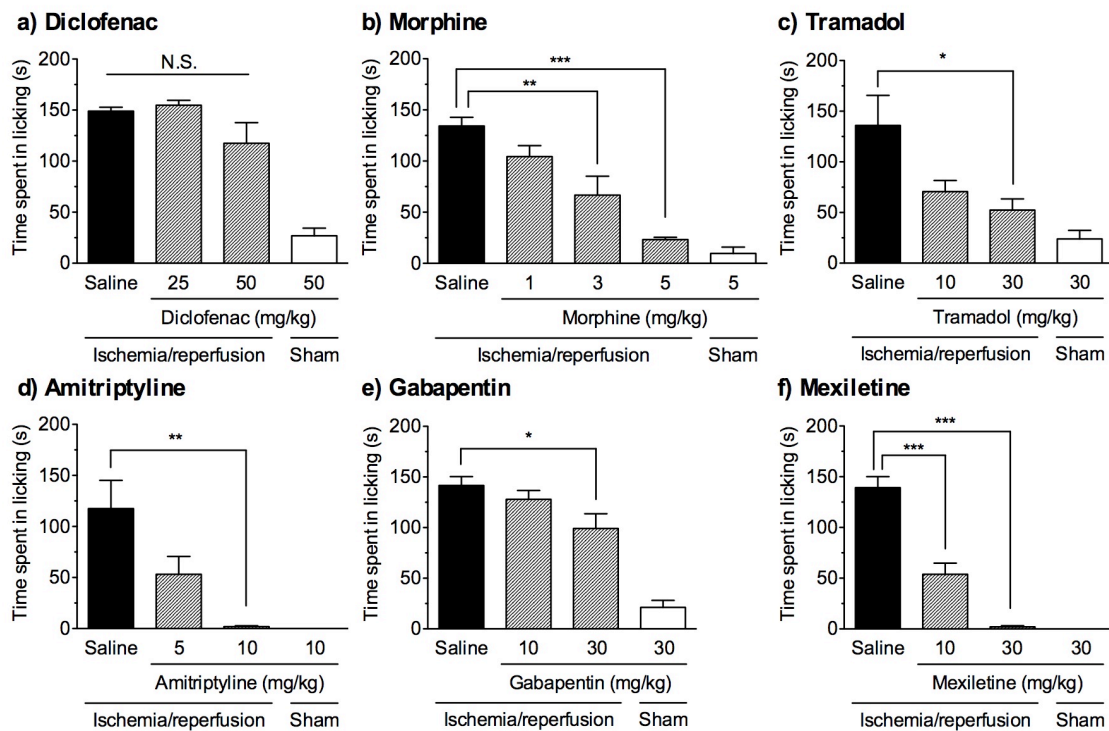


図 1-7 後肢虚血/再灌流誘発 licking 行動における鎮痛薬の効果

(A) ジクロフェナク (25 and 50 mg/kg)、(B) モルヒネ (1, 3 and 5 mg/kg)、(C) ترامadol (10 and 30 mg/kg)、(D) アミトリプチリン (5 and 10 mg/kg)、(E) ガバペンチン (10-30 mg/kg)、(F) メキシレチン (10 and 30 mg/kg)、溶媒 (saline) を後肢再灌流 30 分前に i.p. 投与した。Sham 処置群にはそれぞれの薬物の最大量を投与した。後肢虚血/再灌後 40 分後までの licking を呈した合計時間を測定した。n=5-9, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

考察

ヒトにおいて、四肢における虚血とそれに続く再灌流は、痛みや感覚鈍麻をともなうしびれを惹起する。本章はマウスにおいて、末梢の虚血/再灌流により、痛みを伴ったしびれを表現した自発的licking行動を観察した初めてのエビデンスとなる。

後肢の半永久的な虚血動物モデルは、虚血による痛み (15,16) だけでなく末梢動脈疾患における病態生理学的な評価をおこなうために広く用いられている (35-38)。加えてこれまでの報告から、数時間の後肢の虚血後の再灌流は、疼痛が遅延し、さらにこの疼痛が惹起されピークを迎えるのが再灌流数日後という虚血後疼痛を誘発することが示唆される (11,12,17,19)。一方本章の結果では15-60分の虚血は再灌流後すぐに自発的licking行動が観察され、それは比較的短時間で消失することが示された。このことから疼痛が遅延する虚血後疼痛と一過性の後肢虚血/再灌流による自発的lickingは異なることが示唆され、自発的licking行動は神経の構造的な障害ではなく、一過性の後肢虚血/再灌流による機能的な障害によるものだと考えられる。Sasaki *et al.*の報告では1-10分という短い後肢の虚血後、自発的licking行動が惹起され、これは再灌流後から10分間に観察された。一方本章における検討で、より長い60分の後肢の虚血により、再灌流後0-10分のearly phasesと10-40分のdelayed phasesの二相性の自発的licking行動を惹起することが示された。この二相のうちearly phasesは(30)と類似していたのに対し、delayed phasesは後肢虚血がより長い60分においてのみ惹起された。また本章のモデルでは、30分以上の後肢虚血におい

て、虚血中だけではなく、再灌流後も持続する触覚鈍麻も示された。このように自発的 licking 行動と触覚鈍麻が併発することは一見矛盾しているようだが、臨床所見においてはしびれが錯感覚や感覚鈍麻など様々な感覚を含むことが明確に示されている (1,2)。この触覚鈍麻を呈した時間は虚血処置時間の長さに依存していたが、自発的 licking 行動を呈した時間には依存していなかった。このことから、自発的 licking 行動が示す痛みを伴うと思われるしびれと、触覚鈍麻は独立しており異なるメカニズムが存在することが示唆される。

ニューロメーターの検討において、C、A δ 、A β 線維の応答は虚血中とそれ続く再灌流時に減少していたが、その回復においては C、A δ 線維に比べ、A β 線維は比較的遅かった。この結果に沿うように、ヒト、動物において、圧迫による虚血により、より太い有髄線維において応答が減少することが報告されている (42-45)。これらのことは、やさしい機械刺激を受容する A β 線維が、C、A δ 線維と比較して圧迫による虚血に脆弱であることを示唆している。

後肢虚血/再灌流により惹起される自発的 licking は様々な鎮痛薬や鎮痛補助薬、オピオイド、三環系抗うつ薬、電位依存性 Ca²⁺チャネル $\alpha_2\delta$ リガンド、電位依存性 Na⁺チャネルブロッカーにより抑制された。しかし NSAID では抑制されなかった。これらの結果は後肢虚血/再灌流により惹起される自発的 licking は主に痛みの側面の強いしびれを表したものであることが示唆しており、またこのしびれは触覚鈍麻も併発した。一方神経障害性疼痛の第一選択薬であるガバペンチンは既報と同様に (30) その効果が弱かった。Ca²⁺チャネル $\alpha_2\delta$ -1 サブユニットの DRG 神経と脊髄における発現は、神経障害性疼痛モデルにおいて上昇しており、これがガバペンチンの抗アロディニア作用に寄与していることが

報告されている (46,47) 。一方、ガバペンチによる作用が見られない神経障害性疼痛モデルにおいては Ca^{2+} チャネル $\alpha_2\delta-1$ サブユニットの発現上昇は見られていない (46,47) 。これらのことから、60 分の一過性後肢虚血では、DRG 神経や脊髄において Ca^{2+} チャネル $\alpha_2\delta-1$ サブユニットの発現上昇が惹起されず、これによりガバペンチンの効果が弱かった可能性が考えられる。

以上本章において、著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。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。

第二章

第 2 章 虚血/再灌流によるしびれの分子メカニズム

第 1 章で著者はマウス後肢/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。

これまでに、後肢虚血もしくは虚血/再灌流により惹起された痛みのモデルがいくつか用いられてきた。慢性虚血モデルにおいては、後肢への 3 時間の虚血と再灌流により機械刺激や冷刺激に対する痛覚過敏/アロディニアと自発的疼痛行動が、再灌流後 8 時間からみられ、数週間持続しており、このモデルは複合性局所疼痛症候群 I のモデルとして認識されている (11,12,13,14)。同様に大腿動脈血栓または閉塞によって誘発される虚血性の痛みモデルが報告されている (15-17)。これらの痛みモデルを用いた報告から、虚血または虚血/再灌流による酸化的なストレスは虚血性の痛みに寄与することが示唆されている (11, 17-19)。

Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) は非選択的カチオンチャネルであり、侵害受容性 C 線維に高発現しており、ポリモーダル侵害受容器として働いている (20)。TRPA1 は非常に多くの刺激により活性化することが知られており、活性酸素種/窒素種 (ROS/RNS) や高酸素によっても活性化し、その活性化は TRPA1 の N 末端における可逆的な共有結合や、酸化修飾を介する (21-28)。一方、TRPA1 は低酸素によっても活性化する。これは低酸素下では酸素感受性プロリン水酸化酵素 (PHD) の活性低下がおこり、これにより TRPA1 の活性を抑制していた TRPA1N 末端に存在するプロリン残基の水酸基

がはずれ、TRPA1 は活性化すると報告されている (26)。また当研究室ではこれまで、白金系抗がん剤であるオキサリプラチンによって誘発される急性末梢神経障害は TRPV1 や TRPM8 ではなく、TRPA1 の感作によって惹起される事を報告した (29)。

本章では、後肢虚血/再灌流によって惹起されるしびれの分子メカニズムを明らかにするために、マウス後肢虚血/再灌流後に惹起されるしびれ行動における ROS や TRPA1 の関与、また TRPA1 はどの様に ROS に対して活性化あるいは感作するのかを検討した。

実験方法

1) 実験動物

実験には雄性の ICR 系マウス（生後 6-7 週齢；日本 SLC、静岡）もしくは C57BL/6J 系マウス（生後 6-8 週齢；日本 SLC、静岡）を使用した。TRPA1-KO マウスは Jackson Laboratory から購入した。TRPV1-KO マウスは Dr. David Julius (University of California, San Francisco, USA) より供与していただいた。すべての KO マウスはバックグラウンド系統である C57BL/6J 系マウスに 10 世代戻し交配させた。全ての動物は室温が $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、明暗周期が 12 時間の室内で飼育し、餌および水は自由に摂取させた。実験は全て京都大学動物実験委員会による審査・承認を受け、「動物実験に関する日本薬理学会指針」を遵守して行われた。

2) 使用薬物

TEMPOL、PBN、capsaicin は Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) より、HC-030031 は Haoyuan Chemexpress (Shanghai, China) より、DMOG は Frontier Scientific (Logan, UT, USA) より、 H_2O_2 と AITC は和光純薬工業（大阪）より購入した。

3) 後肢虚血/再灌流によるしびれモデルの作成

第一章実験方法に同じ

4) 後肢血流の測定

第一章実験方法に同じ

5) 後肢虚血/再灌流による自発的licking行動の測定

第一章と同じ

6) 機械刺激感受性の測定

第一章と同じ

7) H₂O₂足底内投与による逃避行動の測定

マウスはH₂O₂投与1時間前から観察用アクリルチャンバー（直径, 30 cm; 高さ, 50 cm）に馴化させた。H₂O₂（1.5%, 20 μL/paw）もしくは saline（20 μL/paw）を右後肢にi.pl.投与し、投与後5分間の処置側後肢におけるlickingやflickingなどの逃避行動を呈した合計時間を測定した。DMOG（25 μg/paw）もしくはsaline（20 μL/paw）はH₂O₂投与の1時間前に右後肢にi.pl.投与し、HC-0300311（100 mg/kg）もしくは vehicle（0.5% methylcellulose）はH₂O₂投与の30分前に腹腔内に投与した。

8) AITC足底内投与による逃避行動の測定

マウスはAITC投与1時間前から観察用アクリルチャンバー（直径, 30 cm; 高さ, 50 cm）に馴化させた。TEMPOL（250 mg/kg）、PBN（100 mg/kg）もしくはvehicleをAITC投与の15分前にi.p.投与した。AITC（0.1%, 20 μL/paw）はcorn oil に溶解した後、右後肢にi.pl.投与し、投与後5分間の処置側後肢におけるlickingやflickingなどの逃避行動を呈した合計時間を測定した。

9) 足底内H₂O₂量の測定

足底内H₂O₂量の測定は既存の報告（44）を参考に行った。マウスは60分間の

後肢虚血と5分間の再灌流後、頸椎脱臼を行い、足底を回収した。回収した足底は即時に液体窒素により凍結させた。回収した足底は氷冷させた0.5% hexadecyltrimethylammonium bromideを含む50 mM PBS (pH7.4) 中で、polytron homogenizerを用いてホモジネートした。ホモジネートした足底は15000 rpm、4° Cで2分間遠心分離した後、上澄を回収した。回収した上澄はUltracel-100 membrane (Merck Millipore, Billerica, MA) のAmicon Ultra Centrifugal Filterを用いて、15000 rpm、4° Cで2分間遠心することで濾過を行った。このサンプルにおいて、Amplex Red Assay Kit (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA) を用いてH₂O₂量を測定した。

1 0) HEK293細胞の培養とcDNA形質導入

HEK293細胞は10% FBSを含んだDMEM (Sigma-Aldrich) を用いて37°C、5% CO₂下で培養した。hTRPA1、hTRPA1-P394A、mutPHD2 recombinant plasmid は既報 (26) を参考にし、pCI-neo mammalian expression vectors (Promega Co., Madison, WI) を用いて作成した。HEK293細胞へのcDNA形質導入は、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて、pCI-neo-hTRPA1 (2.0 µg) または、pCI-neo-hTRPA1-P394A (2.0 µg) と pEGFP-C3 (0.5 µg) 、もしくは pCI-neo-hTRPA1 (1.12 µg), pCI-neo-mutPHD2 (1.12 µg), pEGFP-C3 (0.28 µg)を共発現させた。形質転換2日後にPoly-L-Lysineコーティングしたカバーガラス (直径10 mm) に播種後、実験に用いた。

1 1) DRG神経の初代培養

DRG神経は、成体雄性マウスの両側L1-L6腰椎から摘出し、Percoll法を用いて単離した。単離後、細胞をラミニンコーティングしたカバーガラス (3 mm ×

7 mm) に播種し、DMEM (10% FBS含有) を用いて37°C、5% CO₂下で1日培養後、実験に用いた。

1 2) 細胞内Ca²⁺イメージング

細胞は、カバーガラスに播種後、蛍光Ca²⁺指示薬 Fura-2/AM (5 μM) を含むKrebs-Ringer液 (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 10 mM glucose, 10 mM HEPES; pH 7.4; 0.01% cremophore EL含有) 内で、37°Cで30-40分間インキュベートした。Ca²⁺測定用画像解析装置 (HC Image; 浜松フォトニクス) を用いて、励起波長340 nmおよび380 nmの蛍光強度を取得し、算出された蛍光強度比 (F₃₄₀/F₃₈₀) を細胞内Ca²⁺濃度変化の指標として測定した。

1 3) 低酸素負荷および再酸素負荷

チャンバーの酸素濃度は、Stage Top Incubator INUBSF-ZILCS (Tokai Hit, 静岡) の下で、Digital Gas Mixer GM-8000デジタル・ガス・ミキサー(Tokai Hit, 静岡)によってコントロールした。Krebs-Ringer バッファ中の酸素濃度は、Licox-JBOX (メディカルエージェント、京都) によって記録した。酸素濃度は2.7mmHg/分〜の早さで100、90または80mmHgまで減少させた。細胞は30分の低酸素処置を行い、その後Digital Gas MixerとH₂O₂を含んだ通常酸素濃度のバッファを2倍量加えることで、すばやく通常酸素濃度である160mmHgまで酸素濃度を戻し、再酸素負荷とした。

1 4) 統計解析

値は全て、平均値±標準誤差で標記した。二群間の差はStudent's *t*-testにより、

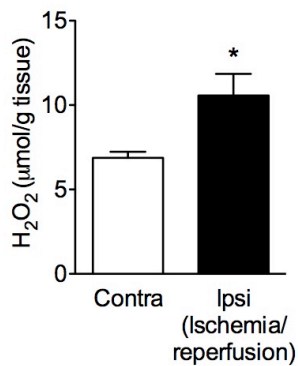
三群以上の差は、one-wayあるいはtwo-way ANOVAおよびBonferroni *post hoc* testにより解析した。 $P < 0.05$ の差を有意であると見なした。

結果

第一節 後肢虚血/再灌流誘発 licking 行動における ROS の関与

虚血後の再灌流時に酸素を含む血液が虚血組織に再灌流されることで産生される ROS により酸化障害が惹起されることは報告されている (31,32)。そこで、虚血/再灌流処置をほどこしたマウス後肢において再灌流 5 分後の H_2O_2 量を測定したところ、無処置の反対側と比較して有意に H_2O_2 量が増加していた (図 2-1 a)。次にこの ROS が後肢虚血/再灌流誘発 licking 行動に関与するか、ROS スカベンジャーである 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy (TEMPOL) と α -phenyl-*tert*-butyl nitron (PBN) を用いて検討した。Slaine を投与したマウスと比較して、再灌流 15 分前に TEMPOL (250 mg/kg) もしくは PBN (100 mg/kg) を i.p.投与したマウスでは有意に自発的 licking 行動が減弱していた ($F_{2,15} = 22.7, p < 0.001$)。Sham 処置群においては変化は見られなかった (図 2-1 b)。さらにこの結果を early phases (0 – 10 min) と delayed phases (10 – 40 min) に分けて解析したところ early phases (図 2-2 左; $F_{2,15} = 20.4, p < 0.001$)、delayed phases (図 2-2 右; $F_{2,15} = 8.13, p < 0.01$) どちらにおいても有意に自発的 licking 行動が減弱した。一方 TRPA1 アゴニスト allyl isothiocyanate (AITC; 0.1%, 20 μL /paw) の足底内投与による逃避行動においては、TEMPOL (250 mg/kg)、PBN (100 mg/kg)を投与しても差は見られなかった (図 2-3)。このことから、後肢虚血/再灌流により産生される ROS を介した licking は TEMPOL と PBN により減弱されるが、TRPA1 刺激による逃避行動は減弱されないことが示唆された。

a) H₂O₂ production



b) ROS scavengers

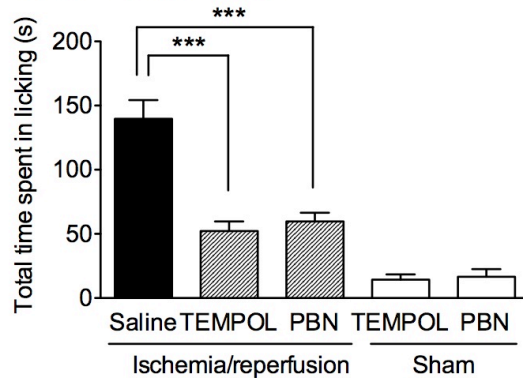


図 2-1 後肢虚血/再灌流誘発 licking 行動における ROS スカベンジャーの効果

(a) 後肢虚血/再灌流後の H₂O₂ (μ mol/g tissue) の産生。H₂O₂ 量を 60 分間の虚血後、再灌流五分後の無処置の反対側 (contra) と処置側 (ipsi) の後肢にて測定した。n = 5, *P < 0.05, vs contralateral. (b) 後肢虚血/再灌流誘発 licking 行動における ROS スカベンジャーの効果。TEMPOL; 250 mg/kg、PBN; 100 mg/kg、もしくは vehicle を再灌流 15 分前に i.p.投与し、再灌流後 40 分間の処置側に対する licking を呈した合計時間を測定した。n = 6, ***P < 0.001.

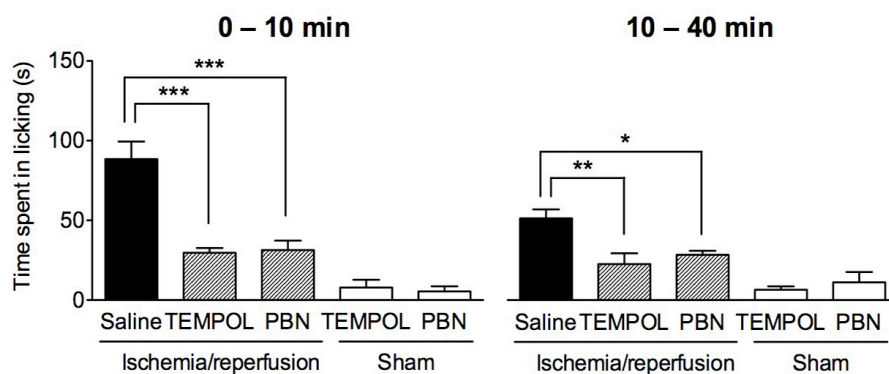


図 2-2 後肢虚血/再灌流誘発 licking 行動の early phases と delayed phases における ROS スカベンジャーの効果

TEMPOL; 250 mg/kg、PBN; 100 mg/kg、もしくは vehicle を再灌流 15 分前に i.p.投与した。early phases (0 – 10 min) と delayed phases (10 – 40 min) に分けて再灌流後の自発的 licking 行動の合計時間を解析した。n = 6, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

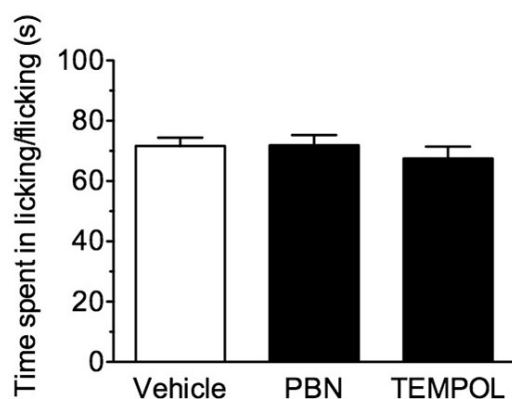


図 2-3 AITC 誘発逃避行動における ROS スカベンジャーの効果

TEMPOL; 250 mg/kg、PBN; 100 mg/kg、もしくは vehicle を AITC 投与 15 分前に i.p.投与した。AITC; 0.1%, 20 μ L/paw を i.pl.投与後 5 分間の処置側に対する逃避行動 (licking や flicking) の合計時間を測定した。n = 6.

第二節 後肢虚血/再灌流誘発 licking 行動における TRPA1 の関与

次にレドックス感受性チャネルである TRPA1 (26,27) が後肢虚血/再灌流誘発 licking 行動に関与するか TRPA1-KO マウスも用いて検討を行った。

後肢虚血/再灌流による血流の変化において、WT マウスと TRPA1-KO マウスの間に有意な差はなかった (図 2-4 a; $F_{1,8} = 0.16$, $p = 0.70$)。さらに von Frey filament による機械刺激に対する感受性も WT マウスと TRPA1-KO マウスの間に有意な差はなかった (図 2-4 b; $F_{1,9} = 1.78$, $p = 0.21$)。一方後肢虚血/再灌流による自発的 licking 行動においては、WT マウスと比較して、TRPA1-KO マウスにおいて、有意に自発的 licking 行動が減弱していた。しかし、TRPV1-KO マウスにおいては有意な差はなかった (図 2-4 c)。同様に TRPA1 アンタゴニスト HC030031 (10, 30 and 50 mg/kg) を虚血処置直前に i.p.投与すると、投与量依存的に有意に自発的 licking 行動が減弱した ($F_{3,21} = 20.0$, $p < 0.011$)。

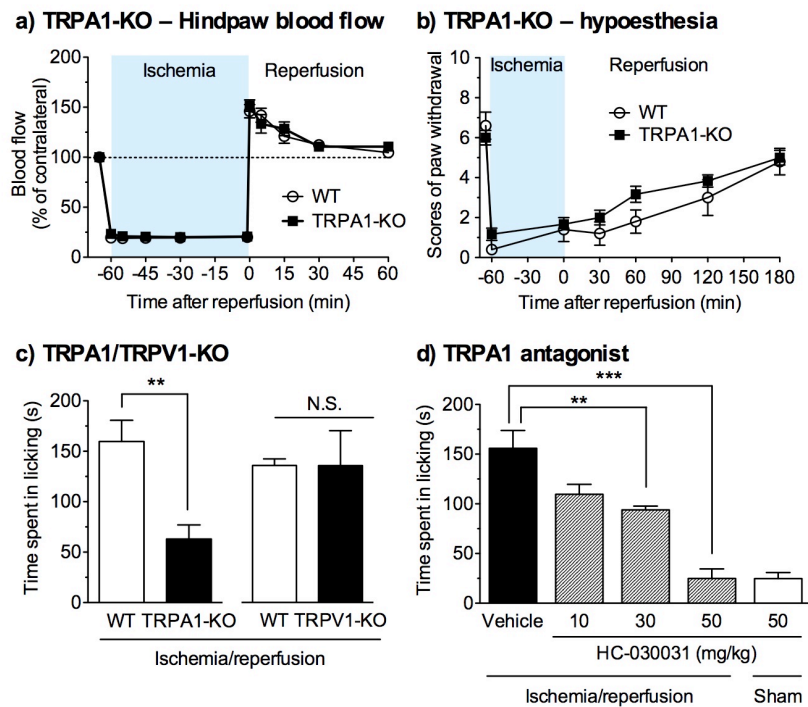


図 2-4 後肢虚血/再灌流における TRPA1 の関与

(a) WT または TRPA1-KO マウスの後肢に虚血/再灌流処置を施し、無処置の反対側と処置側両方の足底の血流量を測定した。処置側の血流量は反対側で平均化し、虚血処置前の値を 100% とした。n = 5. (b) WT と TRPA1-KO マウスにおける虚血/再灌流中の機械刺激に対する感受性は、von Frey filament を用いて測定した。逃避行動はスコアにより記録した。n = 5-6. (c) WT、TRPA1-KO、TRPV1-KO マウスにおける虚血/再灌流後の自発的 licking 行動の合計時間を、再灌流後 40 分まで測定した。n = 5-9. ** $P < 0.01$. N.S. = not significant. (d) TRPA1 アンタゴニスト HC030031 (10, 30, and 50 mg/kg) を虚血処置直前に i.p. 投与し、虚血/再灌流後の自発的 licking 行動の合計時間を、再灌流後 40 分まで測定した。n = 5-7, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

さらにこの結果を early phases (0-10 min) と delayed phases (10-40 min) に分けて解析したところ、TRPA1-KO マウスにおいて early phases (図 2-5 a 左)、delayed phases (図 2-5 a 右) どちらにおいても WT マウスと比較して有意に自発的 licking 行動が減弱した。しかし TRPV1-KO マウスでは差がなかった。同様に、HC030031 投与においても early phases (図 2-5 b 左; $F_{3,21} = 8.48$, $p < 0.001$)、delayed phases (図 2-5 b 右; $F_{3,21} = 6.85$, $p < 0.01$) どちらにおいても有意に自発的 licking 行動が減弱した。

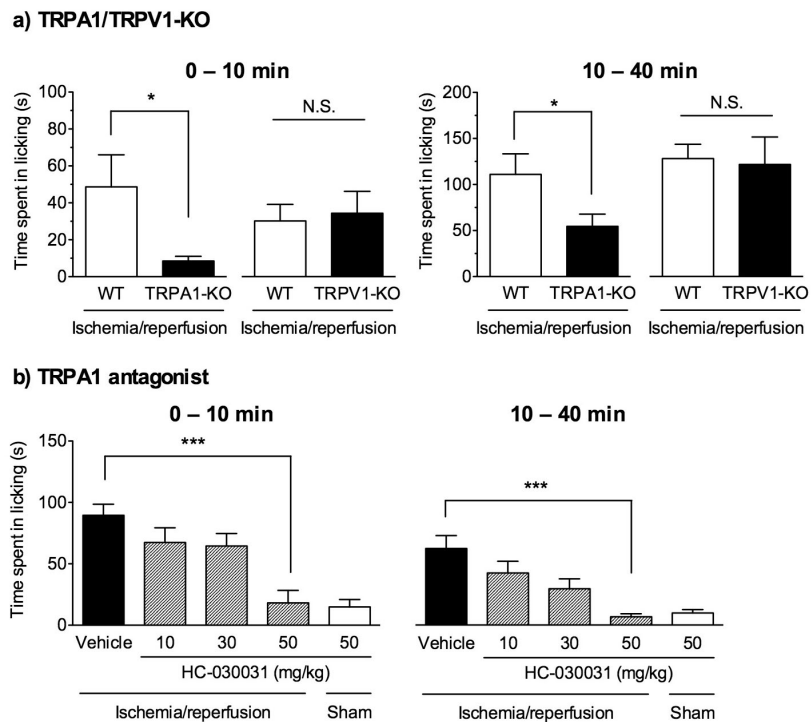


図 2-5 後肢虚血/再灌流誘発 licking 行動の early phases と delayed phases における TRPA1 の関与

WT、TRPA1-KO、TRPV1-KO マウスにおいて後肢虚血再灌流後の licking を呈した合計時間を early phases (0 – 10 min) と delayed phases (10 – 40 min) に分けて解析した。 $n = 5-9$. $*P < 0.05$. N.S. = not significant. (b) TRPA1 アンタゴニスト HC-030031 (10, 30, and 50 mg/kg) もしくは vehicle を虚血処置直前に i.p.投与した。early phases (0 – 10 min) と delayed phases (10 – 40 min) に分けて再灌流後の自発的 licking 行動の合計時間を解析した。 $n = 5-7$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$.

第三節 急激な低酸素負荷による TRPA1 の活性化

次に虚血/再灌流により惹起される自発的 licking 行動においてどの様に TRPA1 が関与するか、そのメカニズムについて検討するために hTRPA1 を強制発現させた HEK293 細胞を用いて、Fura-2AM による細胞内 Ca^{2+} イメージングにて解析を行った。細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の変化は F340/F380 ratio (ΔRatio) で表した。

酸素分圧を通常の $PO_2 = 160 \text{ mmHg}$ ($21\%O_2$) から $PO_2 = 80 \text{ mmHg}$ ($10.5\%O_2$) まで急激に減少させると、これまでの TRPA1 は低酸素負荷により活性化するという報告 (26) と同様に、hTRPA1 発現細胞において急速な細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の上昇が観察された。

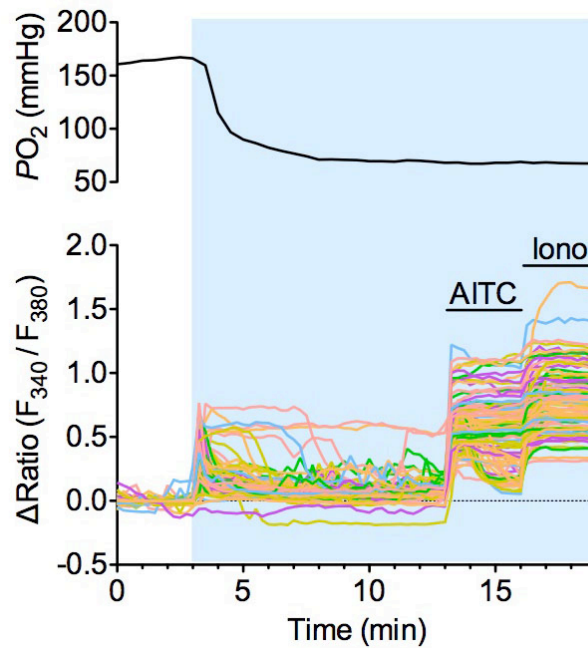


図 2-6 急激な低酸素負荷による TRPA1 の活性化

h-TRPA1 強制発現 HEK293 細胞において、Krebs-Ringer バッファー内の酸素分圧を $PO_2 = 80 \text{ mmHg}$ (10.5% O_2) まで急激に低下させた時の、酸素分圧変化 (上段) と個々の $[Ca^{2+}]_i$ 変化 (下段; F_{340}/F_{380} ratio; Δ Ratio) を記録した。AITC, 100 μM ; Iono, ionomycin, 3 μM .

第四節 低酸素負荷による H₂O₂ 誘発 TRPA1 活性化の増強

次に低酸素負荷を行う速度を落とし、徐々に酸素濃度を低下させた場合について、前節と同様に Fura-2AM による細胞内 Ca²⁺イメージングを用いて検討を行った。

酸素濃度は通常酸素濃度の場合 $PO_2 = 160 \text{ mmHg (21\%O}_2)$ で固定した (図 2-7 a)。低酸素負荷時は $PO_2 = 160 \text{ mmHg (21\%O}_2)$ から 20-30 分かけて徐々に $PO_2 = 80 \text{ mmHg (10.5\%O}_2)$ まで酸素濃度を低下させた (図 2-7 b)。その低酸素負荷中においては、少数の TRPA1 発現細胞が反応したのみであった (図 2-7 b)。

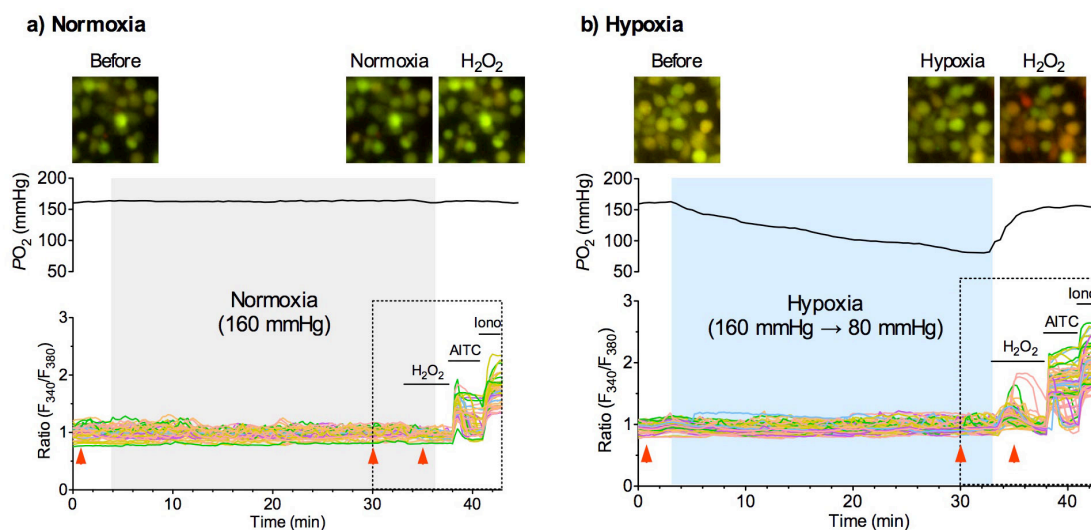


図 2-7 ゆっくりとした低酸素負荷における酸素濃度変化と細胞の反応

hTRPA1 を発現させた HEK293 細胞において、Krebs-Ringer バッファー内の酸素濃度を通常大気圧下での酸素分圧 (PO_2) である 160 mmHg に維持するか (a; normoxia)、もしくは 30 分間で PO_2 が 80 mmHg になるようゆっくり低酸素負荷をかけた (b; hypoxia)。30 分後、酸素濃度は急激に 160 mmHg までもどし、同時に H_2O_2 (10 μ M) を投与した。Allyl isothiocyanate (AITC; 100 μ M) とイオノマイシン (Iono; 3 μ M) は TRPA1 の発現と細胞の生存を確認するために投与した。酸素濃度と細胞内 Ca^{2+} 濃度 [Ca^{2+}]_i (F_{340}/F_{380} ratio) はすべての処置が終了するまで記録を続けた。(上段) 細胞蛍光イメージ画像。(中段) バッファー内酸素濃度の変化。(下段) 個々の細胞における F_{340}/F_{380} ratios。赤三角は細胞蛍光イメージ画像を取得した時点。

$PO_2 = 80$ mmHg 30 分の低酸素負荷の後、酸素濃度を $PO_2 = 160$ mmHg まで急激に戻し、同時に通常酸素濃度のバッファーに溶解した H_2O_2 ($10 \mu M$) を投与した。 H_2O_2 の濃度は TRPA1 の機能の変化を最も観察しやすい $10 \mu M$ を選択した。Mock を発現させた細胞においては、通常酸素 ($PO_2 = 160$ mmHg)、低酸素負荷 ($PO_2 = 80$ mmHg) どちらでも H_2O_2 による $[Ca^{2+}]_i$ の変化は観察されなかった (図 2-8 a,d)。また hTRPA1 発現細胞において通常酸素 ($PO_2 = 160$ mmHg) の場合、 $10 \mu M$ の H_2O_2 では $[Ca^{2+}]_i$ の上昇ほとんどみられない、もしくはごくわずかしき観察されなかった (図 2-8 b)。一方 hTRPA1 発現細胞において低酸素負荷 ($PO_2 = 80$ mmHg) をかけると、 $10 \mu M$ の H_2O_2 により、多数の細胞において $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が見られた (図 2-8 c)。さらに低酸素負荷時の酸素濃度を $PO_2 = 100$ mmHg (13.2% O_2), 90 mmHg (11.8% O_2), 80 mmHg (10.5% O_2) とし解析したところ、 H_2O_2 誘発 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇による F340/F380 ratio の変化 (Δ Ratio) は酸素濃度に依存して上昇していた ($F_{3,20} = 9.02$, $p < 0.001$)。そして $PO_2 = 80$ mmHg において有意に上昇していた (図 2-8)。

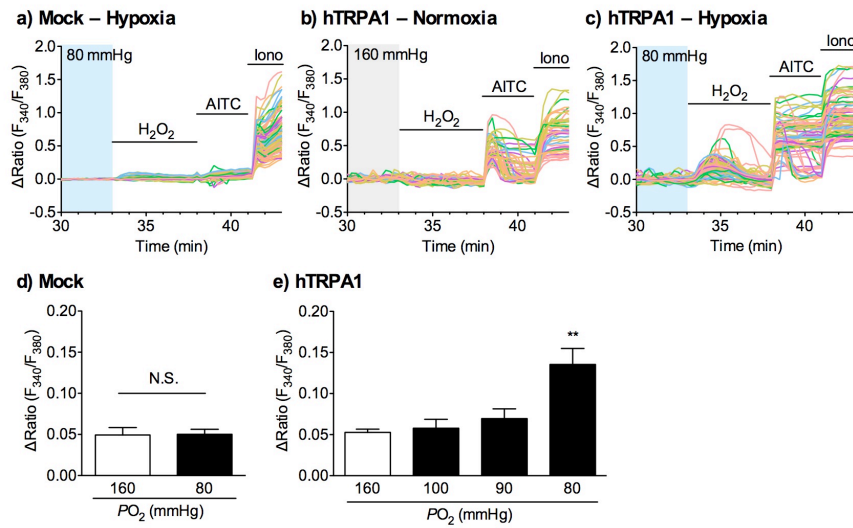


図 2-8 hTRPA1 発現細胞における H₂O₂ 誘発 TRPA1 活性化に対する低酸素の影響

HEK293 細胞に、vector (a, d; mock) 、もしくは hTRPA1 cDNA (b, c, e) 発現させ、30 分通常酸素 (160mmHg) もしくは低酸素負荷 (100, 90, 80 mmHg) 負荷をおこない、その後 H₂O₂ (10 μM) を投与し 5 分間観察した。(a-c) 個々の [Ca²⁺]_i の変化を F340/F380 ratio の変化 (ΔRatio) として表した。(d, e) H₂O₂ を投与している 5 分間 (33–38 min) の ΔRatio の最大値の平均を、H₂O₂ 投与による [Ca²⁺]_i の増加として解析した。AITC, allyl isothiocyanate, 100 μM; Iono, ionomycin, 3 μM. $n = 5-6$, ** $P < 0.01$, compared with normoxia (160 mmHg). N.S. = not significant.

同様に低酸素負荷後の H_2O_2 による Ca^{2+} 応答について WT マウスと TRPA1-KO から単離培養した DRG 神経を用いて検討をおこなった。WT マウス DRG 神経においては、通常酸素濃度 (160mmHg) 30 分処置において、 $20.9 \pm 5.8\%$ の DRG 神経で $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 投与による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が見られた。そして 30 分の低酸素負荷 (80mmHg) をおこなうと H_2O_2 投与による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が増強した。 H_2O_2 感受性神経数も通常酸素濃度時と比較して低酸素負荷により有意に増加していた (図 2-9 a-c)。一方 TRPA1-KO マウスから単離した DRG 神経においては $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 に反応する神経はごくわずかしおらず、低酸素負荷 (80mmHg) をおこなっても変化はみられなかった。 H_2O_2 感受性神経数も通常酸素濃度時と低酸素負荷時で有意な差はなかった (図 2-9 d-f)。

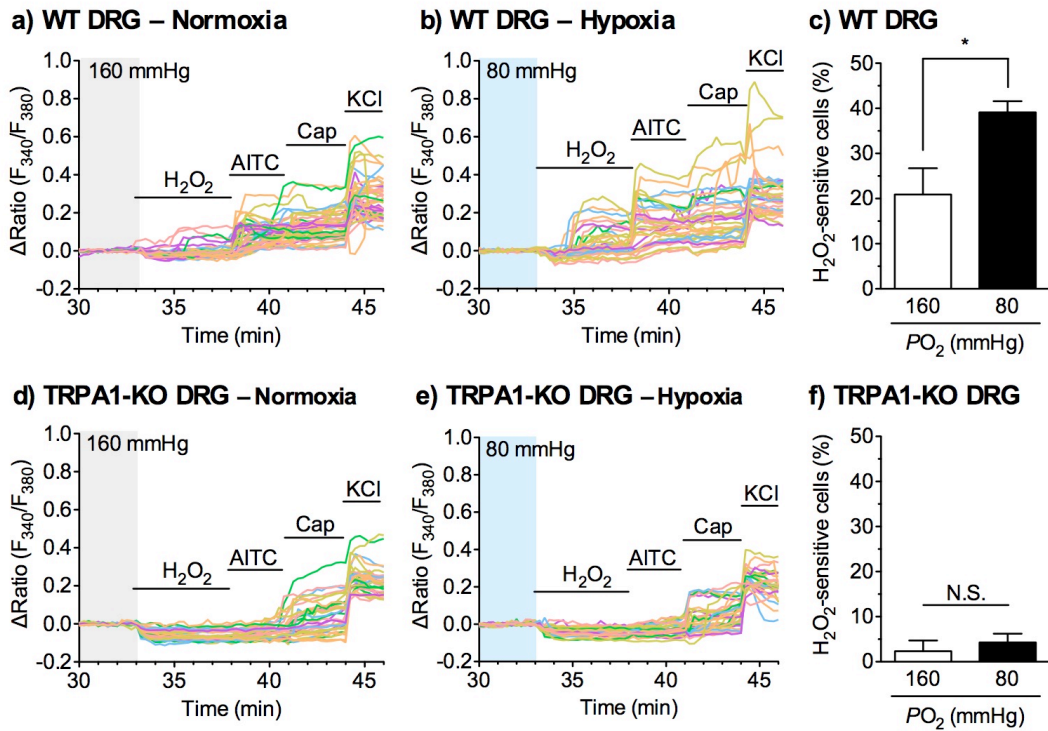


図 2-9 マウス培養 DRG 神経における H₂O₂ 誘発 TRPA1 活性化に対する

低酸素の影響

WT マウス (a-c) もしくは TRPA1-KO (d-f) マウスから単離した培養 DRG 神経は通常酸素 (160mmHg) もしくは低酸素負荷 (80mmHg) を 30 分間おこない、H₂O₂ (100 μM) を 5 分間処置した。(a, b, d, e) 個々の細胞における [Ca²⁺]_i を F₃₄₀/F₃₈₀ ratio の変化 (ΔRatio) で表した。(c, f) 50 mM KCl 感受性神経における H₂O₂ 感受性神経の割合 *n* = 5–6 AITC, allyl isothiocyanate, 100 μM; Cap, capsaicin, 0.3 μM; KCl, 50 mM. **P* < 0.05. N.S. = not significant.

第五節 H₂O₂ に対する低酸素誘発 TRPA1 感作における PHD と TRPA1-N 末端プロリン残基の関与

低酸素により PHD の活性が低下することがこれまでに報告されている (33, 34)。hTRPA1 はこの PHD による 394 番目のプロリン残基 (Pro³⁹⁴) の水酸化を介して活性が抑制されている (26)。H₂O₂ に対する低酸素誘発 TRPA1 感作において、PHD の活性低下と hTRPA1 Pro³⁹⁴ の脱水酸化が関与するか、ドミナントネガティブな human PHD2 mutant (mutPHD2) と hTRPA1 Pro³⁹⁴ が alanine に置換した PHD が作用できない hTRPA1-P394A mutant (26) を用いて検討をおこなった。

hTRPA1 と vector (mock) を共発現させた HEK293 細胞において、30 分の低酸素負荷 (80 mmHg) により H₂O₂ による [Ca²⁺]_i 上昇が通常酸素濃度時 (160 mmHg) と比較し増強していた。hTRPA1 と mutPHD2 を共発現させた細胞においては、通常酸素濃度時に H₂O₂ による [Ca²⁺]_i 上昇が高い傾向があったが、低酸素負荷 (80 mmHg) において H₂O₂ による [Ca²⁺]_i 上昇に変化はみられず、通常酸素濃度時と低酸素負荷時の間に差はなかった (図 2-10 a)。同様に hTRPA1-P394A を発現させた細胞でも、通常酸素濃度時に H₂O₂ による [Ca²⁺]_i 上昇が高い傾向があったが、通常酸素濃度時と低酸素負荷時の間に差はなかった (図 2-10 b)。

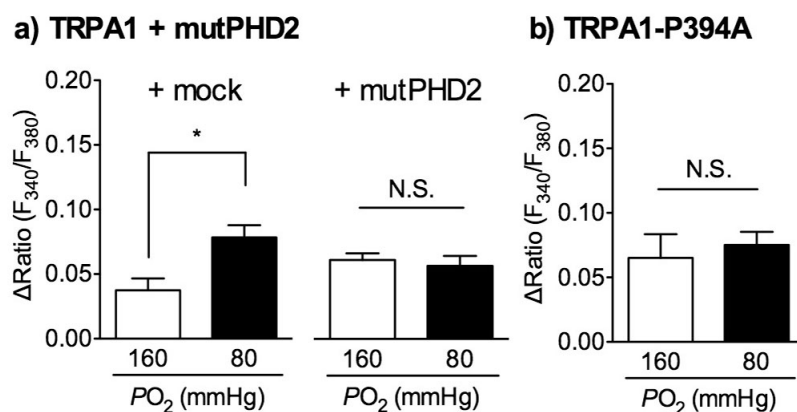


図 2-10 H₂O₂ に対する低酸素誘発 TRPA1 感作における PHD と hTRPA1 Pro³⁹⁴ の関与 (a, b) hTRPA1 と vector (mock)、もしくは dominant negative mutant である hPHD2 (mutPHD2) cDNA を共発現 (a)、または hTRPA1-P394A cDNA を発現 (b) させた HEK293 細胞において、30 分の通常酸素 (160mmHg) もしくは低酸素負荷 (80mmHg) をおこない、その後 H₂O₂ (10 μM) を投与した。H₂O₂ による [Ca²⁺]_i 上昇は H₂O₂ を投与している 5 分間の ΔRatio の最大値の平均により解析した。n = 5, *P < 0.05. N.S. = not significant.

第六節 PHD 抑制による TRPA1 を介した H₂O₂ 誘発逃避行動の増強

最後に PHD 阻害薬 DMOG がマウスにおいて TRPA1 を介する逃避を増強するか検討をおこなった。

前処置として Vehicle を i.pl.投与したマウスにおいては、H₂O₂ (0.5%, 20 µL/paw) の i.pl 投与により処置側への licking や flicking が観察されたが、saline i.pl 投与群では見られなかった。H₂O₂ 投与による逃避行動を示した合計時間は、DMOG (25 µg/paw) を前処置したマウスにおいて、Vehicle を前処置したマウスと比較して有意に増加した。この増加は HC-030031 (100 mg/kg, i.p.) の前投与により、有意に減弱した。しかし Vehicle を前処置したマウスにおいてはみられなかった (図 2-11)。

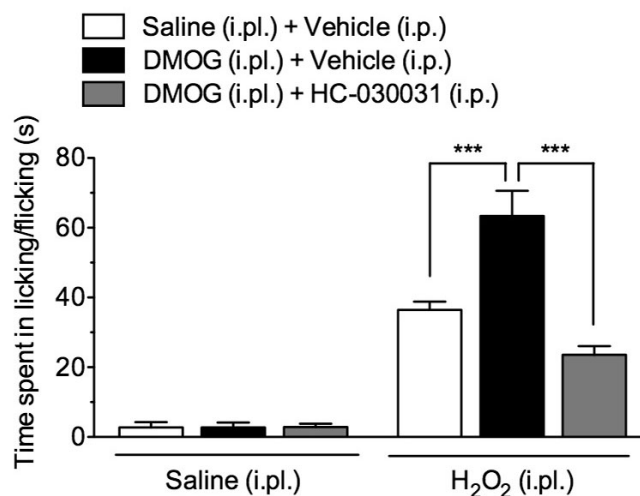


図 2-11 H₂O₂ 誘発逃避行動における PHD 抑制の影響

マウスに PHD 阻害薬 (DMOG25 µg/paw)、もしくは saline を i.pl 投与した。1 時間後、H₂O₂ (1.5%, 20 µL/paw) を i.pl 投与し、投与後 5 分間の処置側に対する licking や flicking を呈した合計時間を測定した。TRPA1 阻害薬 HC030031 (100 mg/kg) もしくは vehicle は H₂O₂ 投与の 30 分前に i.p.投与をした。 $n = 5-8$, *** $P < 0.001$.

考察

虚血/再灌流による産生される ROS は虚血後の疼痛において重要な役割を担っていることは多く報告されてる (11,17,18)。虚血/再灌流は過剰な ROS の産生により感覚神経の障害を引き起こし、さらに脂質の過酸化やタンパク質酸化、Ca²⁺のオーバーロード、DNA の障害、炎症性サイトカインの産生などを引き起こす (32,39)。加えて、ROS は酸化感受性をもつ TRPA1 や TRPV1 を活性化させることが出来る。本章での結果は一過性の後肢虚血/再灌流により発生した ROS が、TRPV1 ではなく TRPA1 を活性化し、自発的 licking 行動を惹起することが示唆される。この結果に沿うように、ミトコンドリアの機能障害において産生された ROS が TRPV1 ではなく TRPA1 を優先的に活性化させることが報告されている (40)。ROS/TRPA1 が関与する自発的 licking 行動は主に痛みの側面のしびれを表現していると考えられる。著者は、自発的 licking 行動における early phases、delayed phases どちらにおいても ROS スカベンジャーとよ TRPA1 阻害により抑制されることを見出した。Early phases では恐らく ROS と TRPA1 の活性化で誘発される。しかし、Delayed phases においてはホルマリンテストの様に、早期の ROS/TRPA1 活性化を介した異なるメカニズムが存在する可能性があるため、そのメカニズムは不明である。一方 TRPA1 は冷刺激による ROS 産生、カルシトニン関連遺伝子タンパク/サブスタンス P の放出を介した血管の収縮反応と弛緩反応にそれぞれ関与することが示された (41)。しかし著者の結果では、TRPA1 が後肢虚血/再灌流による血流の減少、一過性の増加と回復に関与しないことが示唆されている。

本章において、著者は低酸素により TRPA1 が ROS に対して感作することを明らかにした。後肢虚血/再灌流を模倣するため、TRPA1 発現細胞もしくは培養マウス DRG 神経において、低酸素処置を施しその後再酸素負荷と同時に H₂O₂ を投与した。TRPA1 は高酸素だけでなく、H₂O₂ によってもシステインの酸化修飾を介して活性化される (26-28,42,43)。一方低酸素においては、PHD を介する水酸化が解除されるため、TRPA1 は活性化に導かれる (26)。しかし著者は、低酸素処置が H₂O₂ による TRPA1 の活性化を増強する、つまり TRPA1 が ROS に対して感作することを見出した。この TRPA1 の感作は酸素分圧約 80mmHg において惹起され、これは低酸素による TRPA1 の活性化と一致している。このことは低酸素による TRPA1 の活性化と感作が非常に密接な関係であることを示唆している。TRPA1-KO マウスの DRG 神経においては低酸素負荷をかけても、H₂O₂ による [Ca²⁺]_i 応答は観察されなかった。この結果は、DRG 神経において低酸素は他の ROS 感受性チャネルではなく (42,43)、TRPA1 を選択的に感作していることを示唆している。したがって TRPA1 は感覚神経において、末梢虚血/再灌流による ROS を介した応答の中心的役割を担っていると考えられる。しかし、後肢虚血/再灌流後の自発的 licking 行動は、TRPA1 欠損により完全には抑制できなかつたため、ROS が関与する TRPA1 の活性化以外のメカニズムが関与する可能性を完全に排除することはできない。

TRPA1 Pro³⁹⁴ 残基は通常酸素濃度下では、PHD により水酸化され、これにより TRPA1 の細胞内移行が誘導され、TRPA1 の活性は抑制されている。低酸素下において PHD の活性が低下すると、TRPA1 の水酸化が解除され細胞膜への挿入が起こり TRPA1 は活性化する (26)。本章の結果において低酸素による

TRPA1 の ROS への感作は *mutPHD2* の過剰発現もしくは TRPA1-P394A の発現により抑制された。この結果は、低酸素による TRPA1 の感作は、Pro³⁹⁴ における PHD を介する抑制性的水酸化の抑制により惹起されることが示唆され、これは低酸素による TRPA1 の活性化のメカニズムと類似している。さらにこの結果はマウスの行動において、TRPA1 を介した H₂O₂ 誘発逃避行動が PHD の阻害により増強するという、*in vivo* における検討を支持するものである。しかし、Pro³⁹⁴ の水酸化を抑制することで、TRPA1 の細胞膜への移行が増加するのか、もしくは N 末端のシステイン残基において ROS に対する酸化感受性が増強するのか、更なる検討をおこなう必要がある。

以上、本章において著者は、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。

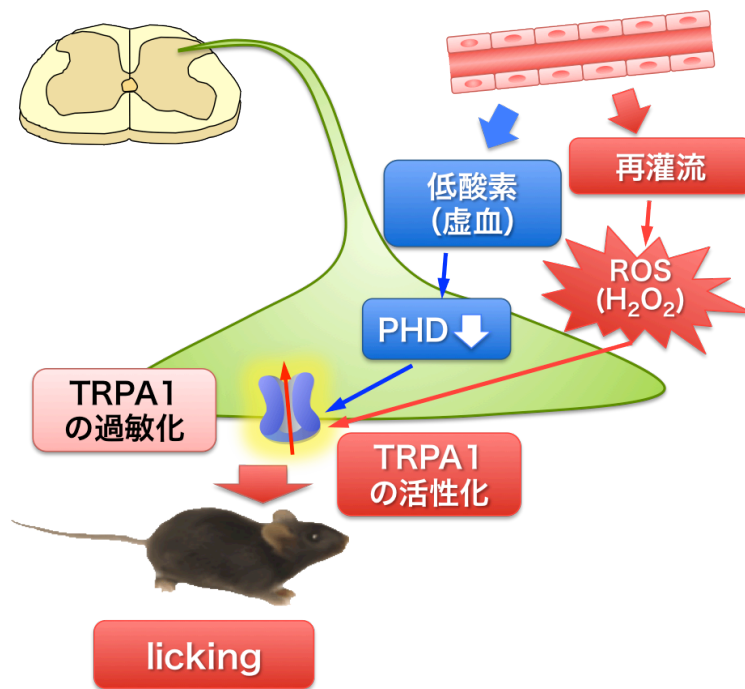


図 2-13 虚血/再灌流によるしびれにおける自発的 licking 行動の発症機序

虚血時の低酸素により PHD の活性低下し、これにより TRPA1 が感作。そこに再灌流時に発生した ROS が TRPA1 に作用することで TRPA1 の活性化が引き起こされ、自発的 licking 行動が惹起される。

総括および結論

本研究において、著者はマウスにおいてしびれモデルの確立を行い、そのメカニズムを解析し、以下の新規知見を得た。

1. マウス後肢に虚血/再灌流を施すことで、ヒトでの正座を模したマウスしびれモデルを確立した。その時の行動を解析すると、機械刺激に対する鈍麻と自発的 **licking** 行動が併発することが明らかとなった。また自発的 **licking** 行動は鎮痛薬である、モルヒネ、トラマドール、ガバペンチン、アミトリプチリン、メキシレチンの投与により抑制されることが明らかとなった。
2. 虚血/再灌流により惹起される自発的 **licking** 行動は、虚血/再灌流時に産生量が増加する ROS と、ROS によって活性化される TRPA1 が関与することが明らかとなった。また、TRPA1 は低酸素負荷により ROS に対して感作を引き起こし、その感作には低酸素により活性が低下する PHD と PHD により水酸化される TRPA1 の Pro³⁹⁴ が関与することが明らかとなった。

以上、著者はマウス後肢虚血/再灌流により触覚鈍麻と自発的 **licking** 行動が併発する動物モデルを確立した。さらに、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 が ROS に対して感作を引き起こすこと、さらに再灌流時に発生した ROS が感作した TRPA1 を強く活性化することにより自発的 **licking** 行動が惹起されることを見出した。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。

謝辞

終わりに臨み、本研究の機会を与えて頂き、終始懇切な御指導と御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科教授 金子周司 先生に謹んで感謝の意を表します。また、直接御指導を頂き支えて下さった京都大学医学部附属病院薬剤部 准教授/副薬剤部長 中川貴之 先生、終始多くの有益な御助言を頂きました准教授 白川久志 先生に心から感謝いたします。さらに、終始有益な御助言を頂きました名古屋大学大学院創薬科学研究科教授 赤池昭紀 先生、京都大学大学院薬学研究科准教授 久米利明 先生、助教 泉安彦 先生、京都大学医学部附属病院薬剤部 助教 今井悟司先生に深く感謝いたします。TRPA1 プラスミドを供与頂いた、京都大大学院工学部教授 森泰夫先生と、TRPV1-KO マウスを供与頂いた University of California Dr. David Julius に深く感謝いたします。研究生活において御指導、御助言をいただきました大阪大学大学院薬学研究科 永安一樹 博士、崎元伸哉 博士、崎元・趙 萌 博士をはじめ諸先輩方に心から感謝いたします。共同研究者として本研究にご協力いただきました京都大学大学院薬学研究科医療薬剤学分野 鄭 有奈 さん、京都大学大学院生体機能解析学分野 三宅 崇仁 修士、緋山 遥 さんに心から感謝いたします。そして、日々の研究生活において互いに切磋琢磨し合えた京都大学大学院生体機能解析学分野、土岸広治 学士、勇昂一 学士、西谷直也 学士、朝倉加代子 学士、浅岡希美 学士、宮之原遵 修士、ならびに、互いに切磋琢磨し合えた京都大学大学院生体機能解析学分野、薬品作用解析学分野の諸氏に深く感謝いたします。

著者の良き理解者であり研究活動に専念できるよう支えて下さった父 達朗、母 美恵子、妹 万紀子、祖母 千恵子に心から感謝いたします。

発表論文目録

Hypoxia-induced sensitization of TRPA1 in painful dysesthesia evoked by transient hindlimb ischemia/reperfusion in mice

(マウス後肢虚血/再灌流によるしびれにおける低酸素誘発性 TRPA1 の過敏化)

Kanako So, Yuna Tei, Meng Zhao, Takahito Miyake, Haruka Hiyama, Hisashi Shirakawa, Satoshi Imai, Yasuo Mori, Takayuki Nakagawa, Kazuo Matsubara, Shuji Kaneko

投稿改訂中

参考文献

1. Jensen, T. S., Gottrup, H., Sindrup, S. H. & Bach, F. W. The clinical picture of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* **429**, 1–11 (2001).
2. Task Force on Taxonomy of the International Association for the study of Pain. *Classification of Chronic Pain, Second Edition*, edited by Merskey H and Bogduk N, IASP Press, Seattle (1994).
3. Mills, J. L. Sr., Buerger's disease in the 21st century: diagnosis, clinical features, and therapy. *Semin. Vasc. Surg.* **16**, 179–189 (2003).
4. Singleton, J. R. Evaluation and treatment of painful peripheral polyneuropathy. *Semin. Neurol.* **25**, 185–195 (2005).
5. Bayramoglu, M. Entrapment neuropathies of the upper extremity. *Neuroanatomy* **3**, 18–24 (2004).
6. Miltenburg, N. C. & Boogerd, W. Chemotherapy-induced neuropathy: A comprehensive survey. *Cancer Treat. Rev.* **40**, 872–882 (2014).
7. Deli, G., Bosnyak, E., Pusch, G., Komoly, S. & Feher, G. Diabetic neuropathies: diagnosis and management. *Neuroendocrinology* **98**, 267–280 (2013).
8. R ger, L. J. et al. Characteristics of chronic ischemic pain in patients with peripheral arterial disease. *Pain* **139**, 201–208 (2008).
9. Cooke, J. P. & Marshall, J.M. Mechanisms of Raynaud's disease. *Vasc. Med.* **10**, 293–307 (2005).
10. Devulder, J. et al. Ischemic pain in the extremities and Raynaud's phenomenon. *Pain Pract* **11**, 483–491 (2011).
11. Coderre, T. J., Xanthos, D. N., Francis, L. & Bennett, G. J. Chronic post-ischemia pain (CPIP): A novel animal model of complex regional pain syndrome-Type I (CRPS-I; reflex sympathetic dystrophy) produced by prolonged hindpaw ischemia and reperfusion in the rat. *Pain* **112**, 94–105 (2004).
12. Ludwig, J., Gorodetskaya, N., Schattschneider, J., J nig, W. & Baron, R. Behavioral and sensory changes after direct ischemia-reperfusion injury in rats. *Eur. J. Pain.* **11**, 677–684 (2007).
13. Xanthos, D. N., Bennett, G. J. & Coderre, T. J. Norepinephrine-induced nociception and vasoconstrictor hypersensitivity in rats with chronic post-ischemia pain. *Pain* **137**, 640–651 (2008)
14. de Mos, M. et al. Role of NFkappaB in an animal model of complex regional pain syndrome-type I (CRPS-I). *J. Pain* **10**, 1161–1169 (2009).
15. Seo, H. S. et al. A new rat model for thrombus-induced ischemic pain (TIIP); development of bilateral mechanical allodynia. *Pain* **139**, 520–532 (2008).
16. Seo, H. S. et al. Peripheral acid-sensing ion channels and P2X receptors contribute to mechanical allodynia in a rodent thrombus-induced ischemic pain model. *J. Pain* **11**, 718–727 (2010).
17. Muthuraman, A., Ramesh, M. & Sood, S. Development of animal model

- for vasculatic neuropathy: Induction by ischemic-reperfusion in the rat femoral artery. *J. Neurosci. Methods*. **186**, 215–221 (2010).
18. Saray, A., Can, B., Akbiyik, F. & Askar, I. Ischaemia-reperfusion injury of the peripheral nerve: An experimental study. *Microsurgery* **19**: 374–380 (1999).
 19. Coderre, T. J. & Bennett, G. J. A hypothesis for the cause of complex regional pain syndrome-type I (reflex sympathetic dystrophy): pain due to deep-tissue microvascular pathology. *Pain Med.* **11**, 1224–1238 (2010)
 20. Wu, L., Sweet, T. & Clapham, D. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *Pharmacol. Rev.* **62**, 381–404 (2010).
 21. Story, G. M. et al. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* **112**, 819–829 (2003).
 22. Bandell, M. et al. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* **41**, 849–857 (2004).
 23. Kwan, K. Y. et al. TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron* **50**, 277–289 (2006).
 24. Macpherson, L. J. et al. Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature* **445**, 541–545 (2007).
 25. Takahashi, N. et al. Molecular characterization of TRPA1 channel activation by cysteine-reactive inflammatory mediators. *Channels (Austin)* **2**, 287–298 (2008).
 26. Takahashi, N. et al. TRPA1 underlies a sensing mechanism for O₂. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 701–711 (2011).
 27. Kozai, D., Ogawa, N. & Mori, Y. Redox regulation of transient receptor potential channels. *Antioxid. Redox Signal.* **21**: 971–986 (2014).
 28. Shimizu, S., Takahashi, N. & Mori, Y. TRPs as chemosensors (ROS, RNS, RCS, gasotransmitters). *Handb. Exp. Pharmacol.* **223**, 767–794 (2014).
 29. Zhao, M. et al. Acute cold hypersensitivity characteristically induced by oxaliplatin is caused by the enhanced responsiveness of TRPA1 in mice. *Mol. Pain* **8**, 55 (2012).
 30. Sasaki, A. et al. A mouse model of peripheral postischemic dysesthesia: involvement of reperfusion-induced oxidative stress and TRPA1 channel. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **351**, 568–575 (2014).
 31. Fantel, A. G., Mackler, B., Stamps, L. D., Tran, T. T. & Person, R. E. Reactive oxygen species and DNA oxidation in fetal rat tissues. *Free Radic. Biol. Med.* **25**, 95–103 (1998).
 32. Lejay, A. et al. Mitochondria: mitochondrial participation in ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **50**, 101–105 (2014).
 33. Schofield, C. J. & Ratcliffe, P.J. Oxygen sensing by HIF hydroxylases.

- Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 343–354 (2004).
34. Webb, J. D., Coleman, M. L. & Pugh, C. W. Hypoxia, hypoxia-inducible factors (HIF), HIF hydroxylases and oxygen sensing. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 3539–3554 (2009).
 35. Couffinhal, T. et al. Mouse model of angiogenesis. *Am. J. Pathol.* **152**, 1667–1679 (1998).
 36. Gute, D. C., Ishida, T., Yarimizu, K. & Korthuis, R. J. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. *Mol. Cell Biochem.* **179**, 169–187 (1998).
 37. Hourdé, C. et al. Sustained peripheral arterial insufficiency durably impairs normal and regenerating skeletal muscle function. *J. Physiol. Sci.* **56**, 361–367 (2006).
 38. Limbourg, A. et al. Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia. *Nat. Protoc.* **4**, 1737–1746 (2009).
 39. Bağdatoğlu, O. T., Polat, G., Bağdatoğlu, C. & Atik, U. Effects of peripheral nerve ischemia-reperfusion model on serum cytokine levels. *Turk. Neurosurg.* **18**, 149–156 (2008).
 40. Nesuashvili, L., Hadley, S. H., Bahia, P. K. & Taylor-Clark, T. E. Sensory nerve terminal mitochondrial dysfunction activates airway sensory nerves via transient receptor potential (TRP) channels. *Mol. Pharmacol.* **83**, 1007–1019 (2013).
 41. Aubdool, A. A. et al. TRPA1 is essential for the vascular response to environmental cold exposure. *Nat. Commun.* **5**, 5732 (2014).
 42. Andersson, D. A., Gentry, C., Moss, S. & Bevan, S. Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J. Neurosci.* **28**, 2485–2494 (2008).
 43. Sawada, Y., Hosokawa, H., Matsumura, K. & Kobayashi, S. Activation of transient receptor potential ankyrin 1 by hydrogen peroxide. *Eur. J. Neurosci.* **27**, 1131–1142 (2008).
 44. Haraguchi, K. et al.: TRPM2 contributes to inflammatory and neuropathic pain through the aggravation of pronociceptive inflammatory responses in mice. *J. Neurosci.* **32**, 3931–3941 (2012).
 45. Fox, J. L. & Kenmore, P. I. The effect of ischemia on nerve conduction. *Exp. Neurol.* **17**, 403–419 (1967).
 46. Strain, R. E. & Olson, W. H. Selective damage of large diameter peripheral nerve fibers by compression: an application of Laplace's law. *Exp. Neurol.* **47**, 68–80 (1975).
 47. Baron, G. C. & Irving, G. A. Effects of tourniquet ischemia on current perception thresholds in healthy volunteers. *Pain Pract.* **2**, 129–133 (2002).