

論文の内容の要旨

論文題目 炎症性疼痛メディエーターの解析

氏名 池田 由理

炎症反応は、発赤・熱感・腫脹・疼痛を四大兆候とする一種の生体防御反応であるが、過度の反応では逆に生体機能が障害される。特に疼痛が激しいと精神的苦痛も多く、日常生活に支障をきたす。現在、多くの鎮痛薬が治療に用いられているが、より有効で副作用の少ない鎮痛薬の開発のためには、多様な疼痛反応機構の詳細を明らかにすることが必須条件である。

炎症時の疼痛反応は、炎症部位での痛覚受容体の刺激が1次求心性神経線維（主にC線維）を通り、脊髄、視床、大脳皮質知覚領へと伝わることで痛みとして認識されることが知られている。この際、炎症部位で産生されたブラジキニン（BK）、サブスタンスP、プロスタグランジン（PG）や神経系で産生される伝達物質などの様々なメディエーターが関与することが示されてきた。生体内ではこれらのメディエーターが複雑に相互作用し合うことが予想される。そこで本研究では、“炎症性疼痛”のモデルを用いて、いくつかの主要メディエーターの役割と、それらメディエーターの相互作用を解析することを目的とした。

第1章 カラゲニン足浮腫モデルを用いた炎症性疼痛反応のメディエーターの解析

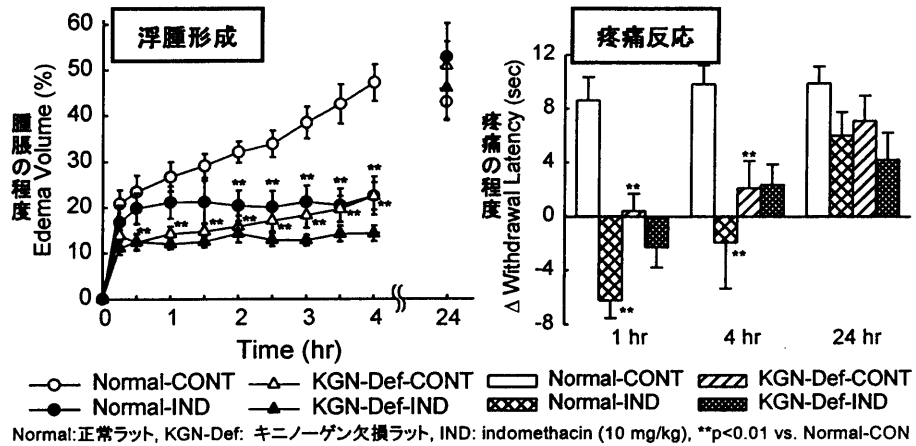
～キニノーゲン欠損ラットとPGI₂受容体欠損マウスを用いた解析～

発痛物質としても知られる炎症性メディエーターのBKは、活性化されたカリクレインにより、前駆物質であるキニノーゲンから産生される。このキニノーゲンを遺伝的に欠損しているラットを用い、足浮腫モデルにおけるBKの関与、さらに、PGとの相互作用を検討した。

カラゲニン（2%, 0.1 ml）を足蹠皮下に投与することにより足浮腫を惹起した。足容積は水かさの変化量として測定し、疼痛反応は足の裏に光（熱刺激）を当て、足を撤去するまでの時間

として測定し、カラゲニン投与前の値との差で表した。キニノーゲン欠損ラットの腫脹・疼痛反応はカラゲニン投与後4時間までは正常ラットに比べ有意に低値であった(図1)。また、BK受容体サブタイプの一つである

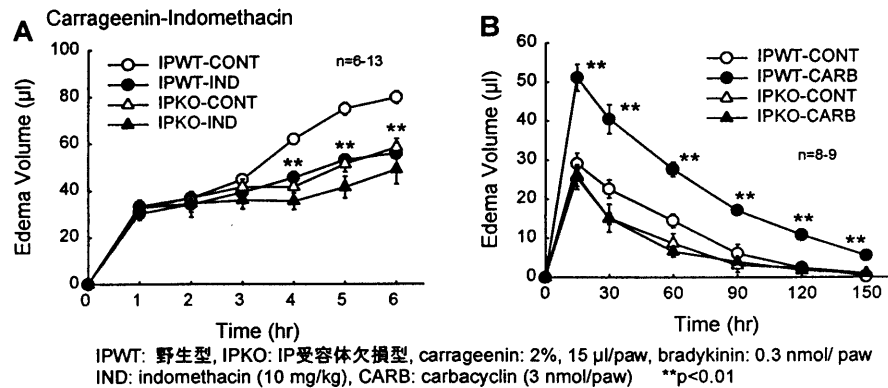
図1 正常ラットとキニノーゲン欠損ラットにおけるカラゲニン誘発足浮腫・疼痛反応に対するインドメタシンの抑制作用の比較



B₂受容体の拮抗薬(FR173657)は、正常ラットの腫脹・疼痛反応をキニノーゲン欠損ラットと同程度まで抑制したが、キニノーゲン欠損ラットの反応には影響しなかった。従って、ブラジキニンがB₂受容体を介して、浮腫ばかりでなく疼痛においても深く関与することが示唆された。次に、シクロオキシゲナーゼ阻害薬であるインドメタシンの作用を同様に比較したところ、正常ラットの腫脹・疼痛反応はインドメタシンにより抑制されたのに対し、キニノーゲン欠損ラットの低値の反応はほとんど影響されなかった。即ち、PGはBKが産生される時のみ浮腫形成・疼痛を促進することが示された(図1)。PGには発痛作用がほとんど無いこと、また、BK刺激によりPGが産生されることは既に報告されているので、このモデルにおいても、BK刺激により産生されたPGが、BK応答を増強する可能性が考えられた。

そこで、どのPGがBK応答の増強に関与しているかを調べるために、PGI₂受容体(IP)欠損マウスを用いて解析した。IP欠損マウスは野生型に比べ、カラゲニンによる腫脹が4時間から6時間

図2 IP欠損マウスのカラゲニン足浮腫に対するインドメタシンの効果(A)とブラジキニン足浮腫に対するPGI₂誘導体の増強作用(B)



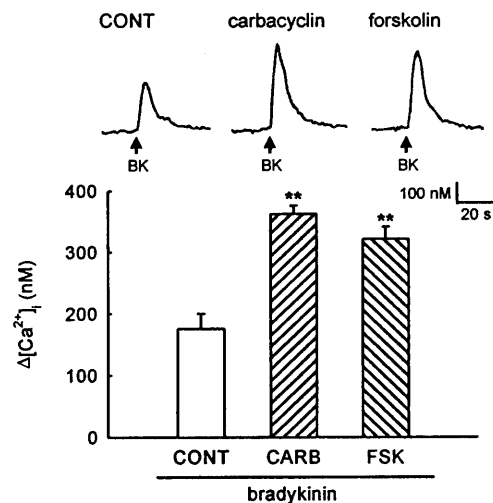
間有意に低値であった(図2A)。また、インドメタシンは野生型の反応をIP欠損マウスと同レベルまで抑制し、IP欠損マウスの反応には影響しなかった。従って、カラゲニンによる足浮腫形成に関与する内因性PGは主にPGI₂であると考えられた。そこで、PGI₂の安定誘導体であるカルバサイクリンをBKと同時に足蹠皮下に投与したところ、顕著な腫脹増強作用が認められた(図2B)。以上より、カラゲニン足浮腫モデルにおける腫脹と疼痛反応の初期には、BKとPGが深く関与すること、また、PGI₂がBKの作用を増強することが示された。

第2章 神経系細胞におけるBK受容体応答の機序とPGとの相互作用の解析

第1章で、カラゲニン足浮腫モデルの腫脹と疼痛にBKとPGI₂の相互作用が重要な役割をしている可能性が示された。そこで、これらのメディエーターの反応を詳細に解明する目的で、神経芽細胞腫であるNeuro-2A細胞を用い、細胞レベルでの解析を試みた。まず、RT-PCR法によりこの細胞にB₂受容体mRNAが恒常的に発現していることを、また、³H]BKを用いた結合実験によりBKの高親和性結合部位が存在することを確認した。次に、B₂受容体応答をFura-2法による細胞内カルシウム濃度([Ca²⁺]_i)変化を指標として検討したところ、B₂受容体作動薬のBK、カリジンは濃度依存的に[Ca²⁺]_iを上昇させた。また、このBK応答はB₂受容体拮抗薬Hoe 140により濃度依存的に抑制されたことから、B₂受容体を介することが確認できた。さらに、BK応答の細胞内情報伝達機構を検討したところ、外液のCa²⁺除去によっては有意な抑制は認められなかったが、PLC阻害薬のU-73122、Ca²⁺ストア枯渇薬のタプシガルジンにより顕著に抑制された。従って、B₂受容体活性化によりPLCを介して細胞内Ca²⁺ストアからCa²⁺が放出することが示唆された。そこで、このBK応答に対するPGI₂の影響を調べたところ、PGI₂誘導体のカルバサイクリン処置によりBK誘発[Ca²⁺]_i上昇は顕著に増強された(図3)。また、PKA活性化薬のforskolinによっても同様の結果を得た。従って、PGI₂誘導体は、IP受容体に作用してcAMPを増加させPKAの活性化を起こすことにより、BK応答を増強すると考えられた。

以上より細胞レベルにおいてもPGI₂によるBK応答の増強が明らかとなり、PGによる腫脹や疼痛の増強機序を考える上で有用なデータとなった。

図3 PGI₂誘導体とforskolinによるBK誘発[Ca²⁺]_i上昇の増強作用



BK: bradykinin (10 nM), CARB: carbacyclin (100 nM), FSK: forskolin (1 μM) 縦軸: bradykinin 単独の[Ca²⁺]_i 上昇応答に対する割合(%), **p<0.01

第3章 酸誘発マウスライジングモデルにおける疼痛性メディエーターの解析

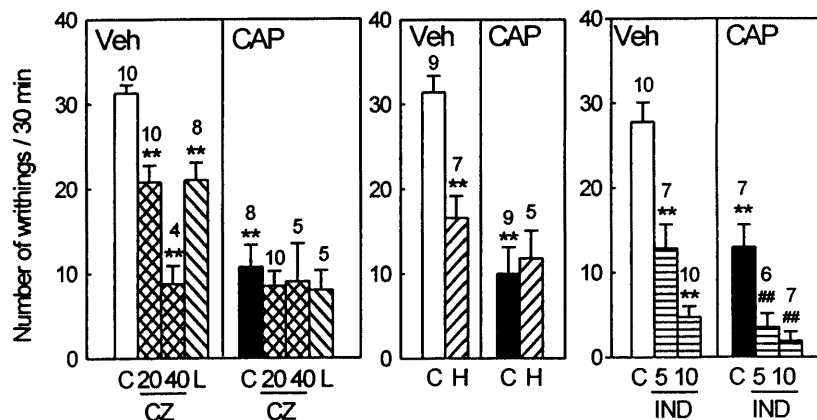
～カプサイシン感受性神経(主にC線維)脱落マウスを用いた解析～

第1章、2章より、PGはBKの作用を増強することで、カラゲニン足浮腫モデルの腫脹と疼痛において主要な役割をすることが推定された。そこで、実際に疼痛モデルとして用いられており、既にPGとBKの関与が知られている酢酸ライジングモデルを応用して、さらに詳細に解析した。最近クローニングされたバニロイドVR1受容体は酸や熱に反応し、痛覚伝導路であるC線維に局在することが報告されているので、本研究では、ライジング反応は酸に共通した反応なのか、またVR1受容体は関与するのか、さらに、C線維の関与があるのか、について検討した。まず、酢酸以外の酸を検討したところ、プロピオン酸と乳酸が、酢酸と類似したライジング反応を誘発することを見出した。本研究で開発したプロピオン酸ライジングモデルを用いて、メディエーターの解析を行ったところ、BKのB₂受容体拮抗薬Hoe 140、インドメタシン、VR1受容体拮抗薬capsazepine、NK₁受容体の拮抗薬L-732138により抑制されたことから、

酸誘発疼痛反応に BK と PG だけでなく、サブスタンス P の関与が、また今回初めて VR1 受容体が深く関与することが推定された (図 4)。また、VR1 受容体拮抗薬は、酢酸、プロピオン酸、乳酸による反応をいずれも抑制したのに対し、中性の発痛物質 phenylbenzoquinone の反応には影響しなかった。従って、腹腔内投与した酸が VR1 受容体に直接作用している可能性が考えられ、酸誘発ライジングモデルにおける VR1 受容体の重要性を明らかにした。この受容体は痛覚伝導路の C 線維に局在するため、新生児期にカプサイシンを皮下投与してカプサイシン感受性一次求心性神経 (主に C 線維) を脱落させたモデルを作成し、C 線維の関与を検討した。この C 線維脱落動物では、酢酸、乳酸、プロピオン酸により誘発するライジング反応が正常動物に比べ顕著に低値であったことから、C 線維を介する痛覚伝導が示された。

そこで、各種メディエーターの作用点を解明する目的で、プロピオン酸ライジングに対する各種阻害薬の作用を C 線維脱落動物と正常動物とで比較したところ、正常動物で見られた capsazepine、L-732138 および Hoe 140 による抑制作用は C 線維脱落動物では見られなかったのに対し、インドメタシンによる強力な抑制作用は両動物群ともに認められた (図 4)。

図4 カプサイシン感受性神経脱落マウス(CAP)と正常マウス(Veh)でのプロピオン酸ライジングにおけるVR1、NK₁、B₂受容体、PGの関与



Z: capsazepine (20, 40 mg/kg), L: L-732138 (5 mg/kg), H: Hoe 140 (0.5 mg/kg), ND: indomethacin (5, 10 mg/kg), C: 各阻害薬の対照群 **p<0.01 vs C of Veh, ***p<0.01 vs C of CAP

以上より、酸誘発疼痛反応には、カプサイシン感受性神経 (主に C 線維) を介する経路における VR1 受容体、NK₁ 受容体、B₂ 受容体の関与が明らかとなった。また、PG は、単独では発痛作用が殆ど無いことが知られているが、カプサイシン感受性・非感受性神経を介する両経路に働いて内在性発痛物質の作用を増強し、強い疼痛反応を生じさせることが示唆された。

まとめ

第 1 章の結果から、カラゲニン足浮腫モデルにおいては、既報の腫脹反応だけでなく、疼痛反応にも BK と PG が主要メディエーターとして関与すること、また、PGI₂ が BK 反応を増強することが推定された。第 2 章では、細胞レベルにおいても PGI₂ による BK 応答の増強が示された。第 3 章の酸誘発疼痛モデルにおいては、BK、PG に加えて、サブスタンス P の関与、また今回初めて VR1 受容体の重要性も示された。さらに、BK、サブスタンス P、VR1 受容体は 1 次求心性神経の C 線維の経路に、PG は C 線維以外の経路においても炎症性疼痛に深く関わっていると推定された。このように、炎症モデルの違いにより疼痛に関与するメディエーターは多様であるが、本研究は、これらのメディエーターの複雑な相互作用の一端を明確に示したものであり、鎮痛・抗炎症薬のターゲットを考える上でも重要な示唆を与えるものと考えている。