

審査の結果の要旨

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、疼痛が激しいと精神的な苦痛となり日常生活にも支障をきたす。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である。

炎症時の疼痛反応は、炎症部位での痛覚受容器の刺激が一次求心性神経線維(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)や神経由来の神経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いる。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、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。

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 の関与および PG との相互作用を検討した。

カラゲニン足蹠皮下投与による足浮腫および熱刺激による疼痛はキニノーゲン欠損ラットでは有意に低値であった。また、ブラジキニン B₂ 受容体拮抗薬 (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、BK は B₂ 受容体を介して、浮腫だけでなく疼痛に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 が産生される時にのみ浮腫形成・疼痛を促進することが示された。PG 自体には発痛作用がほとんど無く、BK 刺激により PG が産生されるので、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。

BK 応答の増強に関与している PG の種類を調べるために、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てカラゲニンによる腫脹が有意に低値であった。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たが、IP 欠損マウスの反応には影響しなかった。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。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を明らかにした。

BK と PGI₂ の細胞レベルでの作用を神経芽細胞腫 Neuro-2A 細胞を用いて検討した。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、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。B₂ 受容体作動薬の BK およびカリジンは濃度依存的に [Ca²⁺] を上昇させ、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 受容体を介する応答であることを確認した。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⁺ ストア枯渇薬のタブ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。PGI₂ 誘導体のカルバサイクリンにより BK 誘発 [Ca²⁺] 上昇は顕著に増強された。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。

以上の研究により、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。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、バニロイド 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。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で検討した。カプサイシン処置動物では、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であることが示された。

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。

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。

以上本研究により、カラゲニン足浮腫および疼痛反応には BK と PG が主要メディエーターとして関与し PGI₂ が BK 反応を増強すること、その経路に cAMP が関与すること、酸誘発疼痛モデルにおいては BK、PG、サブスタンス P の他にバニロイド VR1 受容体が重要な役割を果たすこと、さらに、一次求心性神経の C 線維の経路には BK、サブスタンス P と VR1 受容体が関与し、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こと、が明らかになった。従来は一つのモデルを用いて一つのメディエーターを検討した研究が多かったが、本研究から、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り、メディエーター間に複雑な相互作用があることが明確に示された。これらの知見は炎症のメカニズム解明だけでなく、鎮痛・抗炎症薬の標的としても重要な示唆を与えるものであり、博士(薬学)の授与に値すると結論した。