

# 博士論文

急性痛の病態形成におけるロイコトリエン B4 受容体の役割の解明

浅原 美保

急性痛の病態形成における  
ロイコトリエン B4 受容体の役割の解明

所属： 東京大学大学院医学系研究科外科学専攻生体管理医学講座麻酔学

指導教員名： 山田 芳嗣 教授

申請者名 浅原 美保

## 目 次

1. 要旨	1
2. 略語	2
3. 序文	4
4. 方法	
試薬	11
抗体	12
実験動物	13
疼痛行動実験	
ホルマリンテスト	14
カプサイシンテスト	14
術後痛モデル	14
免疫染色	15
リアルタイム PCR	17
炎症反応の評価	
足容積測定	18
血管透過性	18
好中球ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性	19
フローサイトメトリー	20
BLT1 受容体拮抗薬	21
統計処理	21

## 5. 結果

### 疼痛行動実験

ホルマリンテスト	23
カプサイシンテスト	25
術後痛モデル	25
BLT1 受容体欠損マウスにおける一次求心性線維の特性	28

### 炎症反応の評価

ホルマリン投与後の局所浮腫	34
ホルマリン投与後の好中球 MPO 活性	36
フローサイトメトリー	38

### 転写因子 CREB の活性化に与える影響

ホルマリン足底投与後の脊髄後角での CREB リン酸化の減弱	41
カプサイシン足底投与後の脊髄後角での CREB リン酸化の減弱	44
BLT1 受容体拮抗薬 ONO-4057 の疼痛減弱効果	47
ONO-4057 が中枢性感作に与える影響	49

## 6. 考察

BLT1 受容体欠損マウスの疼痛反応の表現型	51
BLT1受容体欠損マウスにおける一次求心性線維の特性	53
ホルマリン投与後の末梢炎症反応抑制	54
LTB <sub>4</sub> -BLT1シグナルによるTRPV1受容体活性の修飾の可能性	55
BLT1受容体拮抗薬ONO-4057の疼痛減弱効果について	56



ホルマリンあるいはカプサイシン足底投与後の中枢性感作との関連 . . .	57
LTB <sub>4</sub> -BLT1シグナルの脊髄レベルでの痛覚伝達への寄与 . . . . .	57
本研究の限界と今後の課題 . . . . .	59
7. 謝辞 . . . . .	66
8. 引用文献 . . . . .	67

## 1. 「要旨」

強力な白血球走化因子であるロイコトリエン B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>)は、その特異的受容体 BLT1 を介して種々の炎症反応維持に強く関連する。本研究の目的は、急性組織障害性疼痛の病態における LTB<sub>4</sub> の役割解明である。BLT1 受容体欠損マウスでは、ホルマリンあるいはカプサイシン足底投与後の疼痛反応減弱を認めた。

また BLT1 受容体欠損マウスではホルマリン投与後の局所の浮腫と好中球浸潤が減少すると共に、脊髄での転写因子 CREB (cyclic AMP response element-binding protein) の活性化が減弱した。また、BLT1 受容体拮抗薬前投与後のホルマリン投与による疼痛反応の減弱と、脊髄での転写因子 CREB 活性化の減弱効果を確認し、BLT1 受容体欠損マウスで認められた所見が LTB<sub>4</sub>-BLT1 シグナルの欠損によるものであるとの支持を得た。LTB<sub>4</sub> は局所組織障害後の炎症反応促進及び中枢の神経可塑性変化の修飾により急性痛の病態形成に関与する可能性が考えられた。

## 2. 「略語」

AMPA :  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

ATP : adenosine triphosphate

BDNF : Brain-derived neurotrophic factor

CaMK II :  $\text{Ca}^{2+}$  /calmodulin-dependent protein kinase II

CGRP : Calcitonin Gene-related Peptide

CREB : cyclic AMP response element-binding protein

COX : Cyclooxygenase

cPLA<sub>2</sub> : cytosolic Phospholipase A<sub>2</sub>

dNTP : deoxyribonucleotide triphosphates

DTT : Dithiothreitol

DRG : Dorsal Root Ganglion

ERK : Extracellular Signal-regulated Kinase

GPCR : G protein- coupled receptor

Gr-1 : Granulocyte-differentiation antigen-1

i.p. : intraperitoneal

ipl. : intraplantar

i.t. : intrathecal

KPB : Potassium phosphate buffer

LTA<sub>4</sub> : Leukotriene A<sub>4</sub>

LTB<sub>4</sub> : Leukotriene B<sub>4</sub>

LTC<sub>4</sub> : Leukotriene C<sub>4</sub>

LTD<sub>4</sub> : Leukotriene D<sub>4</sub>

LTE<sub>4</sub> : Leukotriene E<sub>4</sub>

mGluR : metabotropic glutamate receptor

MPO : Myeloperoxidase

NK1: Neurokinin 1

NeuN : Neuronal Nuclei

NMDA : N-methyl-D-aspartate

PAF : platelet-activating factor

PBS : Phosphate buffered saline

PFA : Paraformaldehyde

pCREB : phosphorylated cyclic AMP response element-binding protein

PKC : protein kinase C

SNI : Spared Nerve Injury

SP: Substance P

TRPA1 : Transient receptor potential ankyrin 1

TrkB : tyrosine receptor kinase B

TRPV1 : Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1

5-HPETE : 5- Hydroperoxyeicosatetraenoic acid

5-LOX : 5-lipoxygenase

### 3.「序文」

ロイコトリエンはアラキドン酸から生合成される生理活性脂質で、強力な白血球走化作用を有するロイコトリエン $B_4$  ( $LTB_4$ : (5S, 12R), -ジヒドロキシ-6, 14-シス-8,10-トランスエイコサテトラエン酸) と、強力な気管支平滑筋収縮作用を持つシステニルロイコトリエン類 ( $LTC_4$ 、 $LTD_4$ 、 $LTE_4$ ) とに大別される。

アラキドン酸からロイコトリエンへの産生経路を図1に示す。細胞に種々の刺激が加わると、細胞内ホスホリパーゼ $A_2$  ( $cPLA_2$ ) の作用により、細胞膜や核膜を構成するリン脂質からアラキドン酸が切り出され、5-リポキシゲナーゼ (5-lipoxygenase : 5-LOX) の存在下に、5-ヒドロペルオキシエイコサテトラエン酸 (5- HPETE) が産生される。さらに、5-LOX及び5-リポキシゲナーゼ活性化タンパク質 (FLAP) の作用でロイコトリエン $A_4$  ( $LTA_4$ ) が産生される。 $LTA_4$  からロイコトリエン $A_4$  水解酵素 ( $LTA_4$  hydrolase) により $LTB_4$  が産生される。また $LTC_4$  合成酵素の働きで $LTA_4$  がグルタチオン抱合されると $LTC_4$  が生成され、順次 $LTD_4$ 、 $LTE_4$  へと変換される[1]。

$LTB_4$  の受容体としてBLT1、BLT2、の2種類の受容体の存在が確認されている[2] [3]。いずれもG蛋白共役型受容体 (GPCR : G protein- coupled receptor) であり、BLT1が高親和性、BLT2が低親和性であることがわかっている。両受容体の特徴を表1に示す。

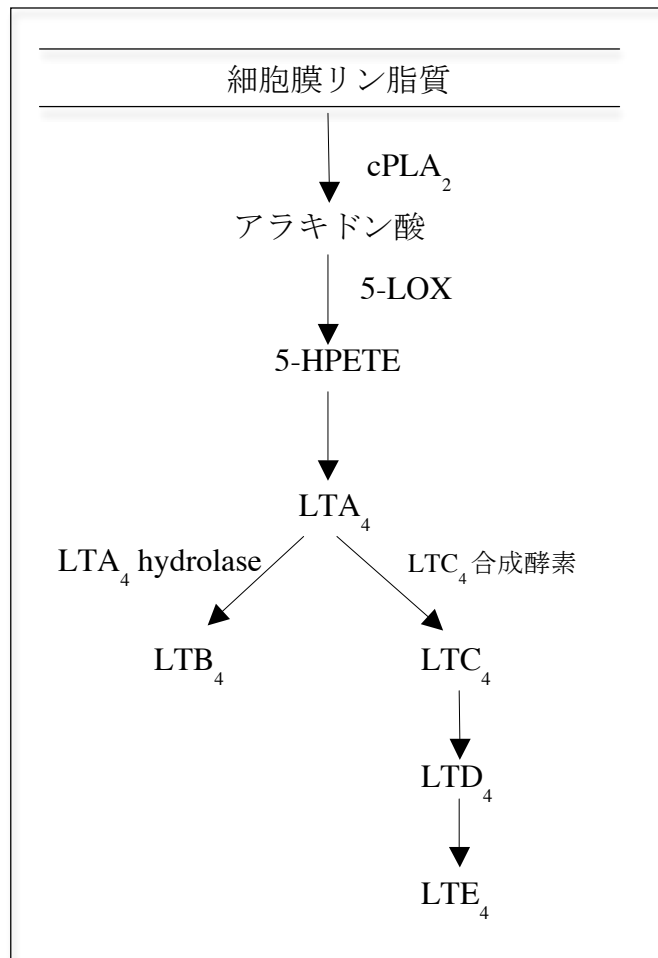


図1 LTB<sub>4</sub>産生経路

表1 BLT1とBLT2受容体の相違点 ([4]より一部改変)

	BLT1	BLT2
Amino acids	352	358
(human) Expression	Leukocytes >> thymus, spleen	Spleen> ovary, liver, leukocytes> ubiquitous
Coupled G-protein	G16,Gi2	Gq2like, Gi-like, Gz-like

BLT1は好中球をはじめT細胞と破骨細胞、単球に発現していることが確認されている[5][6]。一方BLT2は脾臓、卵巣、肝臓の他、生体内の広範囲に分布が認められている。LTB<sub>4</sub>は、受容体が同定される前から新規抗炎症薬の重要な標的として考えられてきた。BLT1受容体欠損マウスを用いた様々な病態モデルを対象とした研究[7][8][9]から、LTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルの生理学的意義が解明されつつある。LTB<sub>4</sub>の生理学的役割として、白血球を炎症部位に強力に走化させる作用、白血球の血管内皮への接着、白血球の活性化（好中球・好酸球からのライソソーム酵素の放出、活性酸素の産生）などの促進が知られている。またBLT1受容体欠損マウスでは気管支喘息モデルにおける気道過敏性の減弱[9,10]、多発性硬化症モデルにおける上下肢麻痺症状軽減[11]、関節リウマチモデルでの関節炎症状軽減[12]、乾癬皮膚炎における皮膚炎症状軽減[13]、骨粗鬆症の骨量減少抑制[5]などが報告され、LTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルと炎症・免疫疾患との強い関連性が示唆されている。

LTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルと疼痛との関連についても報告がある。LTB<sub>4</sub>の局所投与は熱的・機械的痛覚過敏をきたす[14]。また、LTB<sub>4</sub>のくも膜下投与はホルマリン足底注射により生じる疼痛反応を増強し、その増強効果は5-LOX阻害薬あるいはBLT1拮抗薬により抑制される[15]。さらに、ラットを用いた*in situ* hybridization法により、後根神経節（DRG : Dorsal Root Ganglion）及び脊髄においてBLT1が発現することが確認されている[16]。また、神経障害性疼痛モデルの一つであるSNIモデル（spared nerve injury model : 坐骨神経部分損傷モデル）の脊髄においてBLT1 mRNAの発現が増強する[17]。LTB<sub>4</sub>産生酵素であるLTA<sub>4</sub> hydrolaseが脊髄第II層において発現することも確認されている[18]。以上から、LTB<sub>4</sub>-BLT1シグナ

ルが痛覚伝達に関連する可能性が示唆されるが、内在性のLTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルがどのように痛覚伝達系に関与するかについては、未だ十分な検討がなされていない。

痛みは生体防御のために有用な警告反応である。痛みのシグナルは一次求心性線維の自由終末（侵害受容器）から一次求心性線維を介して脊髄後角へと伝わる。一次求心性線維にはA $\delta$ 線維とC線維とがあり、脊髄後角のI、II、V層に入力する。脊髄後角に伝えられた痛み信号は、脊髄内上行路経由で脳幹、視床、大脳皮質などの上位中枢へ伝達される。末梢組織障害や炎症、神経の損傷などの病的な状況下では、侵害刺激に対する閾値が低下して痛覚過敏が生じ、本来痛みを生じないレベルの触覚刺激で痛みを感じるアロディニアなど有害な痛み反応の発生、痛みの慢性化が起きる。このような痛みは、痛覚伝達経路に種々の機能的あるいは器質的な変化が起こった結果生じる。

末梢組織に損傷が加わり炎症が起これば、局所で炎症細胞からプロスタグランジン、アデノシン三リン酸（ATP：adenosine triphosphate）、ブラジキニン、substance P (SP)、プロトンや各種サイトカインなど様々なメディエーターの分泌が促進されて、侵害受容器の閾値低下（末梢性感作）が起きる[19,20]。図2に示すように、一次求心性線維終末からグルタミン酸(Glu)、substance P、脳由来神経成長因子（BDNF: Brain-derived neurotrophic factor）が遊離され、脊髄後角のシナプス後膜に存在するNMDA（N-methyl-D-aspartate）受容体やタキキニン受容体を介して細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇する。引き続いてプロテインキナーゼC（PKC: protein kinase C）と Ca<sup>2+</sup>/calmodulin依存性プロテインキナーゼ（CaMK II: Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II）が活性化され、PKCはAMPA



( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) 受容体のシナプス後膜へのリクルートを促す他、ERK (Extracellular Signal-regulated Kinase) を活性化することで脊髄後角ニューロンの興奮性を増強する[21]。ERKの活性化はまた、転写因子である cyclic AMP response element-binding protein (CREB) のリン酸化を誘導する[19]。リン酸化CREBは遺伝子の転写及び各種蛋白の合成促進に加えて、様々なプロテインキナーゼを活性化する事でシナプス伝達を増強し、神経の可塑性変化、すなわち中枢性感作を誘導する[21-23]。

CREBは細胞外の種々の刺激によって活性化される転写因子で、133番目のセリン残基のリン酸化により活性化される[23]。ホルマリン足底投与後両側の脊髄後角においてCREBの活性化が認められ、またNMDA受容体拮抗薬の前投与によりCREB活性化が抑制されるなどの報告[24,25]があり、CREBの活性化がホルマリン足底投与後の中枢性感作、疼痛反応の持続に寄与する可能性が指摘されてきた。カプサイシン足底投与もまた脊髄後角におけるCREB活性化を介して中枢性感作をもたらすことが報告されている[26,27]。

本研究では、まずLTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルが急性痛において果たす役割を検討するため、BLT1受容体欠損マウスを用いて炎症性疼痛モデルであるホルマリントテスト及びカプサイシンテスト、術後痛モデルの計3つの疼痛モデルを作成し、BLT1受容体欠損マウスの急性疼痛反応の表現型を検討した。続いて、BLT1受容体欠損マウスの一次求心性線維における侵害受容器の特徴を野生型マウスとの間で比較した。一次求心性線維のうち主にC繊維上に発現し[28,29]痛覚シナプス伝達を調節しているTransient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1)、及びTransient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1)について、その発現

の程度を両マウス間で比較検討した。また、C繊維及びA $\delta$  繊維内に分布する[30] ペプチドであるCalcitonin Gene-related Peptide (CGRP)の発現の程度についても検討した。続いて、ホルマリンテスト後の疼痛反応と局所の炎症反応の強さとの関連について検討した。BLT1受容体拮抗薬の投与によるLTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルの阻害がホルマリン由来の疼痛反応に与える影響についても検討した。最後に、LTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルがホルマリンあるいはカプサイシン足底投与により生じる脊髄後角ニューロンでのCREB活性化にどのように寄与するか免疫組織学的手法を用いて調べた。

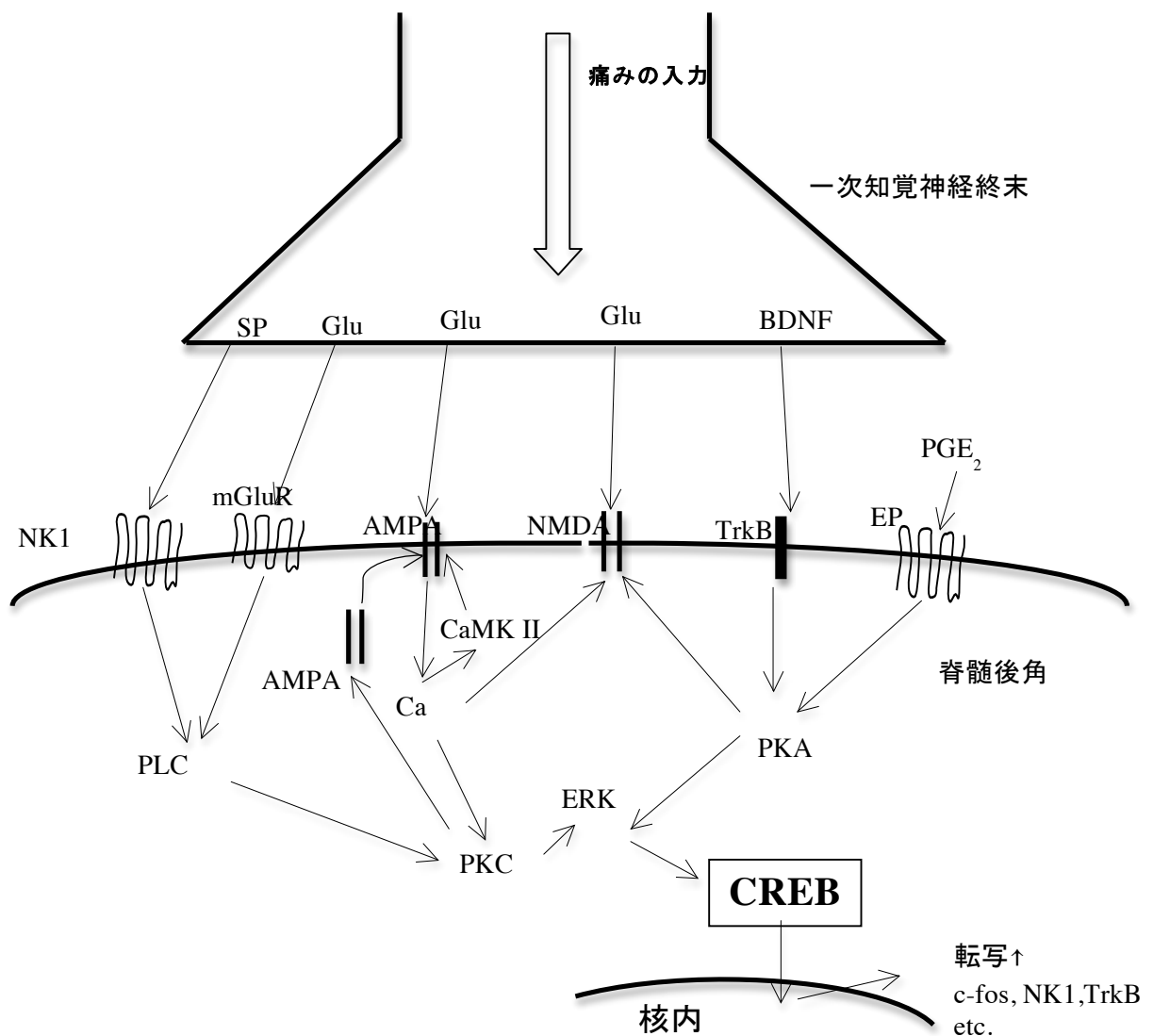


図2 中枢性感作のメカニズム

(Glu: グルタミン酸、NK1: Neurokinin 1、mGluR : metabotropic glutamate receptor 、  
 AMPA:  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid 受容体、SP: Substance P、  
 NMDA: N-methyl-D-aspartate受容体、TrkB : tyrosine receptor kinase B受容体、  
 EP: プロスタグランジン受容体)

#### 4. 「方法」

##### 試薬

ホルマリン：和光純薬工業「20%ホルマリン溶液」を 0.1M PBS で希釈し 5%溶液として用いた。

カプサイシン：Capsaicin (Sigma-Aldrich) を 0.1M PBS に溶解し 0.008% (80 $\mu$ g/ml) 溶液として用いた。

リン酸緩衝 4%PFA 溶液：和光純薬工業「組織固定用 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液」

スクロース溶液：和光純薬工業「スクロース」を 0.1M PBS で希釈し、20%スクロース溶液として用いた。

過酸化水素：和光純薬工業「過酸化水素 30%」を 0.1M PBS で希釈して用いた。

炭酸水素ナトリウム：

大塚製薬工場「メイロン静注 7 %」を0.1M PBSで希釈して用いた。

Triton X-100：Sigma Aldrich 「Triton™ X-100」

イソフルラン：マイラン製薬「エスカイン吸入麻酔液」

エバンスブルー：Evans Blue Dye(Sigma-Aldrich) を 0.1M PBS に溶解し 2%溶液として用いた。

ジメチルホルムアミド：Sigma-Aldrich 「*N,N*-Dimethylformamide for molecular biology,  $\geq 99\%$ 」

## 抗体

### <免疫染色>

抗 TRPV1 (transient receptor potential cation channel subfamily V member 1)抗体：

Anti-TRPV1 antibody、ACC-030、Alomone Labs

抗 CGRP (Calcitonin Gene-related Peptide)抗体：Anti-calcitonin gene related peptide antibody produced in rabbit, whole antiserum、C8198、Sigma-Aldrich

抗 NeuN (Neuronal Nuclei)抗体：mouse anti-NeuN antibody、MAB377、Millipore

Alexa Fluor 488 標識抗体：goat anti-mouse IgG、A11001、Life Technologies

goat anti-rabbit IgG、A11008、Life Technologies

Alexa Fluor 594 標識抗体：goat anti-mouse IgG、A11005、Life Technologies

goat anti-rabbit IgG、A11012、Life Technologies

抗 pCREB (phosphorylated CREB)抗体: Phospho-CREB (Ser133)(87G3)Rabbit mAb、9198、Cell Signaling Technology

ビオチン化ヤギ抗ウサギ IgG 抗体: biotinylated goat anti-rabbit IgG、PK-6101、Vector Laboratories

### <フローサイトメトリー>

PE 標識抗 Gr-1 (granulocyte-differentiation antigen-1)抗体：rat anti-mouse Gr-1／Ly6G -PE、734555、Beckman Coulter

FITC 標識抗 CD11b 抗体：CD11b antibodies human and mouse、130-081-201、Miltenyl Biotec

## 実験動物

成熟雄性 C57BL/6 マウスまたは BLT1 受容体欠損マウス（10-14 週令）を実験に用いた。BLT1 受容体欠損マウスの作成は Terawaki らの方法[9]に従って行い、マウスの遺伝子型は尾より抽出した DNA から genotyping した。

動物は一定の温度湿度コントロール下、12 時間の明暗サイクル（明期 6:00-18:00）にて飼育した。水と飼料は自由摂取とした。実験手順は「動物愛護及び管理に関する法律」を遵守し、東京大学大学院医学系研究科動物実験委員会の東京大学動物実験実施マニュアル及び東京大学動物実験実施規則に従って行った。

## 疼痛行動

### ホルマリンテスト

各動物は 30 分間以上馴化した後に疼痛行動の評価を行った。過去の報告[31]を参考にホルマリン溶液（5%、10 $\mu$ L）をマウスの右後肢足底に 30G 針を用いて皮下投与した。その後観察用ケージに入れ、投与肢に対する licking（舐める）、biting（噛む）、flinching（振り回す）行動をホルマリンによる疼痛反応として、投与直後より 5 分間ごとに、ストップウォッチを用いて疼痛反応の持続時間を計測した。

### カプサイシンテスト

各動物は 30 分間以上馴化した後に疼痛行動の評価を行った。過去の報告[32]を参考に、カプサイシン溶液（1.6 $\mu$ g、20 $\mu$ L）をマウスの右後肢足底に 30G 針を用いて皮下投与した。観察用ケージに入れ投与後 5 分間、投与肢に対する licking（舐める）、biting（噛む）、flinching（振り回す）行動の持続時間をストップウォッチを用いて計測した。

### 術後痛モデル

術後痛モデルはマウス後肢足底に皮切を加えてすぐに縫合して作成する疼痛モデルである。実際の臨床で見られる皮膚切開と同様の刺激を与えて炎症反応を引き起こすことで、切開 2 時間後頃より機械刺激性のアロディニア（疼痛反

応閾値低下)が観察される。術後の疼痛の特徴は、皮膚切開や手術侵襲に伴う炎症による疼痛、体動に伴う機械的刺激による疼痛をあわせた複雑なものであり、自発痛と随伴痛の2つの要素が含まれる。2%イソフルランによる全身麻酔下に、Potzakiらの方法[33]に従って疼痛モデルを作成した。No.11メスを用いてマウス右後肢足底面に5mmの縦切開を加えた後、足底筋を持ち上げながら縦切開し、圧迫止血の後5-0ナイロン糸にて2針縫合した。切開前、切開2時間後、切開1-7日後にvon frey testを行い機械刺激性アロディニアの評価を行った。von frey testは30分間以上の馴化後に行った。von frey testはフィラメントを使用しマウス後肢足底にフィラメントを軽く曲がる程度に押しあて、動物が逃避行動を示す閾値を測定する手法である。フィラメントを押しあてた側の後肢を挙上する行動を逃避行動と規定した。up-down method[34]に従い、中間強度の太さのフィラメントでまず刺激を加え、マウスが逃避行動を呈した場合には一つ下の、逃避行動を示さなかった場合には一つ上の太さのフィラメントで同様に刺激した。マウスの逃避行動の有無に差が見られた前後の2つの反応をはじめの2反応と規定し、その後4回連続して同様の刺激を行い50%閾値(g)を算出した。

## 免疫染色

深麻酔下経心臓的にリン酸緩衝4%PFA溶液を還流し固定した。腰髄膨大部及びL4後根神経節(Dorsal Root Ganglion:DRG)を直視下にて確認の上摘出し、リン酸緩衝4%PFA溶液中で一晩後固定した。20%スクロースを含む0.1 M PBSで置換後包埋材及びcryostat (Leica CM 1850)を用いて10  $\mu$ m厚の凍結切片を作製



し、スライドグラスに貼付した。

免疫染色は蛍光標識抗体法および酵素抗体法（DAB）により行った。

蛍光標識抗体法により TRPV1 (transient receptor potential cation channel subfamily V member 1)、CGRP (calcitonin gene related peptide)、NeuN (Neuronal Nuclei)の局在を、酵素抗体法により pCREB (phosphorylated CREB)の局在を検討した。

蛍光標識抗体法については、まず10%正常ヤギ血清（和光純薬工業）及び0.3% Triton X-100を添加した0.1M PBSにてブロッキング（室温、1時間）を行った後、一次抗体として、抗TRPV1抗体（1:300）、抗CGRP抗体（1:5000）、抗NeuN抗体（1:300）と反応させた（4°C、一晚）。続いて蛍光標識二次抗体（Alexa Fluor 488 標識抗体あるいはAlexa Fluor 594標識抗体）と反応させた後（1:200、室温、2時間）、蛍光顕微鏡を用いて腰部後根神経節及び脊髄後角部を肉眼で同定し、100倍（脊髄後角部）あるいは200倍（腰部後根神経節）の倍率で観察及び写真撮影を行った。撮影画像を用いて陽性ニューロン数を手動でカウントした。

酵素抗体法については、まず内因性ペルオキシダーゼ活性除去目的に0.3%過酸化水素溶液中に30分間反応させた。抗pCREB抗体をブロッキング溶液(0.25% 正常ヤギ血清を含む0.1M PBS)で希釈した溶液と反応させた後（1:400、4°C、一晚）、ビオチン化ヤギ抗ウサギIgG抗体と反応させた（1:200、室温、1時間）。その後Vectastain Elite ABC Reagent（PK-6101、Vector Laboratories）及びDAB基質（ImmPACT™ DAB substrate、SK-4105、Vector Laboratories）を用いて発色させ、光学顕微鏡を用いて脊髄後角部を肉眼で同定し、100倍の倍率で観察及び写真撮影を行った。左右脊髄後角部のpCREB陽性ニューロン数を手動でカウントした。

## リアルタイム PCR

naïve マウスの腰部脊髄及び L1-6 の腰部後根神経節 (DRG) を摘出し、Isogen (ニッポンジーン) または Rneasy mini kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出した。0.5 $\mu$ g の RNA から、SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) を用いた逆転写反応 (42°C、52 分間) により cDNA を合成した。

希釈した cDNA 5 $\mu$ L、プライマー溶液 2 $\mu$ L、real-time PCR SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) 4 $\mu$ L、水 9 $\mu$ L の最終 20 $\mu$ L の反応液を調整した。7500 Real Time PCR system (Applied Biosystems) を用いて、40 サイクルの PCR 反応を行った。PCR 条件は 95°C 15 秒、60°C 50 秒、72°C 20 秒で行った。使用したプライマーの配列を表 2 に示す。標的遺伝子の mRNA の発現量は、ハウスキーピング遺伝子  $\beta$ -Actin の発現量に対する比として算出した。

表 2 リアルタイム PCR で用いたプライマーの配列

Gene	Forward (5'- 3')	Reverse (5'- 3')
TRPA1	CCATGACCTGGCAGAATACC	TGGAGAGCGTCCTTCAGAAT
TRPV1	ACCACGGCTGCTTACTATCG	TCCCCAACGGTGTTATTCAG
$\beta$ -actin	ACCCACACTGTGCCCATCTA	GCCACAGGATTCCATACCCA

## 炎症反応の評価

### 足容積測定

プレシスモメータ (TK-101CMP、UNICOM) を用いた。2%イソフルラン麻酔下に、ホルマリン右後肢足底投与前及び投与 1 時間後のマウス右後肢の足容積を測定した。

足容積増加率 (%) = (ホルマリン投与 1 時間後の足容積－投与前足容積) / 投与前足容積 を算出した。

### 血管透過性

Hu WP らの方法[35]を参考に行った。マウスに 2%エバンスブルー溶液 (80mg/kg) を腹腔内投与し、5 分後にホルマリン溶液または vehicle (0.1M PBS) 10μL を右後肢足底に投与した。1 時間後、深麻酔下に左心室より PBS 30mL を還流し、血管内のエバンスブルーを wash out した。その後、両足組織を摘出して、湿重量測定後に細切して、1mL のジメチルホルムアミド (Sigma Aldrich) を添加して 52°Cで一晩インキュベートした。10,000 x g、20 分間、4°Cにて遠心分離を行い、吸光光度計 (BIORAD) を用いて、波長 620 nm で上清の吸光度を測定した。血管透過性亢進の指標として、薬液投与側後肢におけるエバンスブルー漏出量を反対側肢の漏出量で除した値を用いた。

### 好中球ミエロペルオキシダーゼ(MPO)活性

ホルマリン右足底皮下注射 1 時間後に、深麻酔下に足蹠を摘出した。50 mM KPB (pH 7.4) を加えてホモゲナイズし、14,000 rpm、10 分間、4°Cにて遠心分離後得られた上清を抽出液とした。抽出液中の MPO (Myeloperoxidase) 活性測定は、96 穴プレートを用いて行った。Assay buffer (o-ジアニシジン二塩酸塩 (Sigma Aldrich) 0.157mg/mL、0.0005% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / 50mM KPB; pH 6.0) を添加して反応を開始し、波長 450 nm の吸光度を測定した[36]。検量線は、MPO 活性の標準物質として、Myeloperoxidase, Human Polymorphonuclear Leukocytes (CALBIOCHEM) を用いて作成した。また抽出液中のタンパク量を定量し、20μg タンパク量当たりの MPO 活性として算出した。

## フローサイトメトリー

ホルマリン右足底皮下注射 1 時間後に深麻酔下に足蹠を摘出し、過去の報告 [37]を参考にして細胞浮遊液を得た。足蹠細切後 1 mg/ml collagenase A (Roche) 及び 2.4 U/ml dispase II (Roche) を含む Hanks 緩衝液 (Sigma-Aldrich) で酵素処理を行った (37°C、2 時間)。70  $\mu$ m 及び 35  $\mu$ m のナイロンメッシュに順次通して濾過した後、抗体溶液 (PE 標識抗 Gr-1/Ly6G 抗体 (1:100)、FITC 標識抗 CD11b 抗体 (1:100) )、または標識抗体と同一のアイソタイプコントロール (FITC または PE 標識 IgG) と反応させ (氷上、30 分間)、フローサイトメトリー (Accuri™ C6 フローサイトメーター) で解析した。アイソタイプコントロールをネガティブコントロールとして、足蹠組織の細胞中の好中球 (好中球マーカー CD11b 及び Gr-1/Ly6G が共に陽性の細胞) の増加の程度を検討した (図 3)。

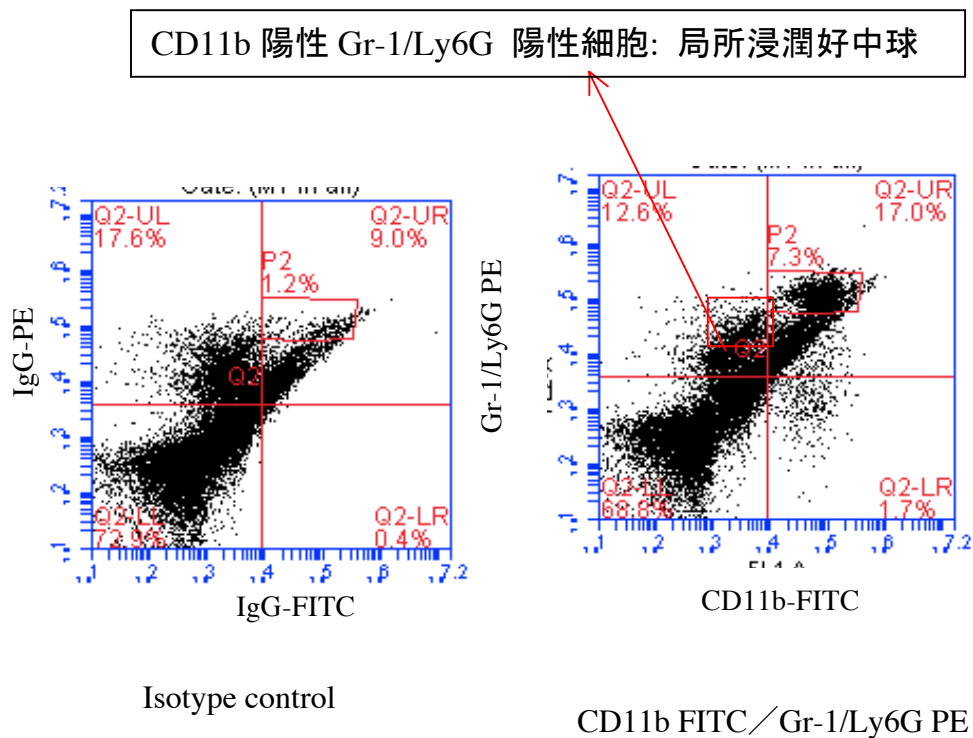


図 3 フローサイトメトリーによる局所浸潤好中球の解析

## **BLT1受容体拮抗薬**

ONO-4057 (5-[2-(2-carboxyethyl)3-{6-(4-methoxyphenyl)-5E-hexenyl}]

oxyphenoxy] valeric acid) は小野薬品工業より供与されたものを用いた。2.1 % 炭酸水素ナトリウム溶液に溶解して使用した。腹腔内投与、足底皮下注射、くも膜下投与の3種の投与経路について、ONO-4057投与がホルマリン足底投与後の疼痛反応に与える影響を検討した。投与量は過去の報告[38,39]を参考に2種類ずつ設定した。

腹腔内投与 (0.125 または0.25 mg、250  $\mu$ L) あるいは足底皮下投与 (0.014または2.35  $\mu$ g、10  $\mu$ L) はホルマリンまたはカプサイシン投与45分前に行った。くも膜下投与 (10または20 $\mu$ g、5 $\mu$ L) はホルマリン投与30分前に施行した。Hyldenの報告[40]を参考として、マウスの背側皮膚剃毛後L5/ 6間の椎間から30G針を装着した25 $\mu$ Lのマイクロシリンジを用いて薬液を投与した。尾を振り動かすtail-flick反応の出現をもって、くも膜下投与の成功とみなした。なお、コントロール動物には、vehicleとして2.1%炭酸水素ナトリウム溶液を投与した。

## **統計処理**

結果は mean  $\pm$  SEM で表記した。行動実験 (ホルマリンテスト・術後痛モデル)、MPO 活性及び免疫組織染色の結果解析には Two-way analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni *post hoc* tests を用いた。行動実験 (カプサイシンテスト)、足浮腫、リアルタイム PCR、免疫組織染色の結果解析には unpaired Student's

*t*-tests with Welch's correction を用いた。血管透過性、フローサイトメトリーの結果解析には Kruskal-Wallis one-way ANOVA を用いた。何れも *p* 値<0.05 をもって有意差ありとした。

## 5. 「結果」

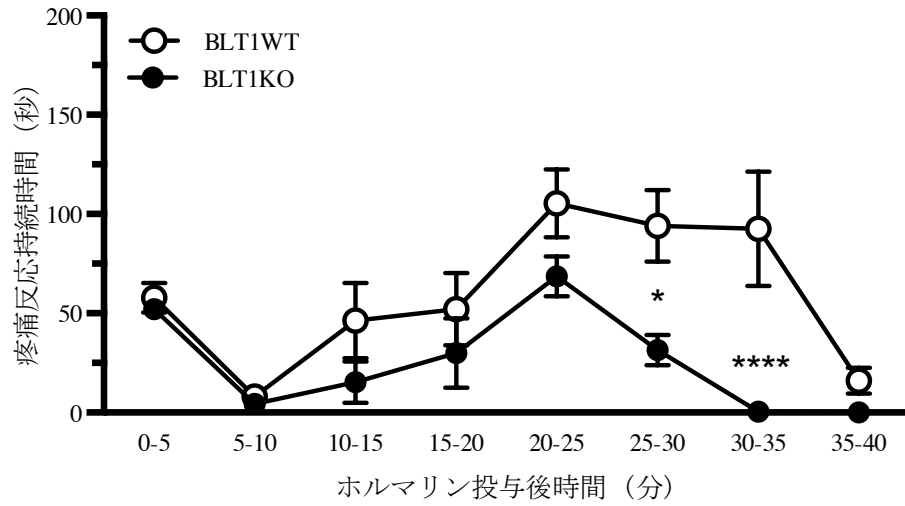
### 疼痛行動実験

#### ホルマリンテスト

BLT1野生型マウスとBLT1受容体欠損マウスの右後肢足底にホルマリンを投与した。疼痛反応はいずれのマウスにおいても2相性で、投与10分以内に認められる疼痛反応(1st phase)と投与11分後以降に再度認められる疼痛反応(2nd phase)が観察された。投与直後より40分後までの間、5分毎に疼痛反応持続時間を計測した結果を図4Aに示す。投与後25分まではBLT1野生型マウスとBLT1受容体欠損マウスとの間で有意な差はなかったが、投与後25-30分、30-35分ではBLT1野生型マウスに比べてBLT1受容体欠損マウスの方が疼痛反応の有意な減弱を認めた (\* $p < 0.05$ 、\*\*\*\*  $p < 0.0001$ )。図4Bには1st phase (投与0-10分後)、2nd phase (投与11-40分後) の各累積疼痛反応持続時間を示す。1st phaseではBLT1野生型マウス、BLT1受容体欠損マウスの間に有意差はなかったが、2nd phaseでは、BLT1受容体欠損マウスの方が、BLT1野生型マウスに比べて疼痛反応持続時間が有意に減弱した (\*\*\* $p < 0.001$ )。



A)



B)

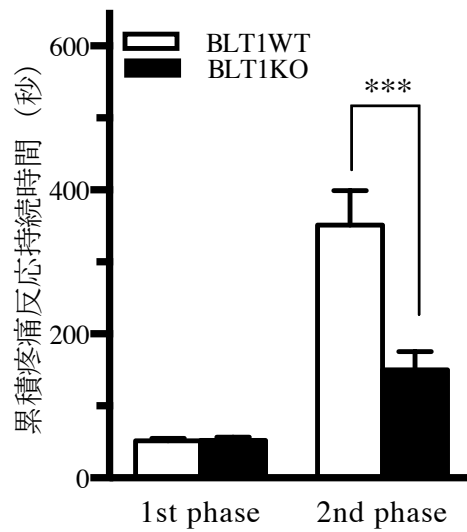


図4 ホルマリンテスト ([67]より改変)

A) 5分毎の疼痛反応持続時間 B)各phaseの累積疼痛反応持続時間

BLT1WT: BLT1野生型マウス、BLT1KO: BLT1受容体欠損マウス

BLT1受容体欠損マウスでは、BLT1野生型マウスに比べて、2nd phaseの反応が有意に抑制された(\*p < 0.05、\*\*\*\* p < 0.0001、\*\*\*p < 0.001 vs. BLT1野生型マウス、n = 5)。

## カプサイシンテスト

BLT1 野生型マウスと BLT1 受容体欠損マウスの右後肢足底にカプサイシンを投与後 5 分間における疼痛反応持続時間を計測した結果を図 5 に示す。BLT1 受容体欠損マウスでは BLT1 野生型マウスに比べて、疼痛反応持続時間が有意に低値であった ( $p<0.01$ )。

## 術後痛モデル

マウス足底面の切開縫合による術後痛モデルを作成し、切開前、切開 2 時間後及び 1～7 日後に von frey test を用いて機械的刺激に対する逃避行動閾値を測定した結果を図 6 に示す。

切開前は、BLT1 受容体欠損マウスと BLT1 野生型マウスとの間で、切開側後肢及び非切開側後肢共に有意差はなかった。切開 2 時間後から 4 日後までにおいては、BLT1 受容体欠損マウスでは BLT1 野生型マウスに比べて、切開側後肢の機械的刺激に対する逃避行動閾値が有意に高値であった (\* $p<0.05$ 、\*\* $p<0.01$ )。非切開側後肢では全観察期間を通じて有意差を認めなかった。

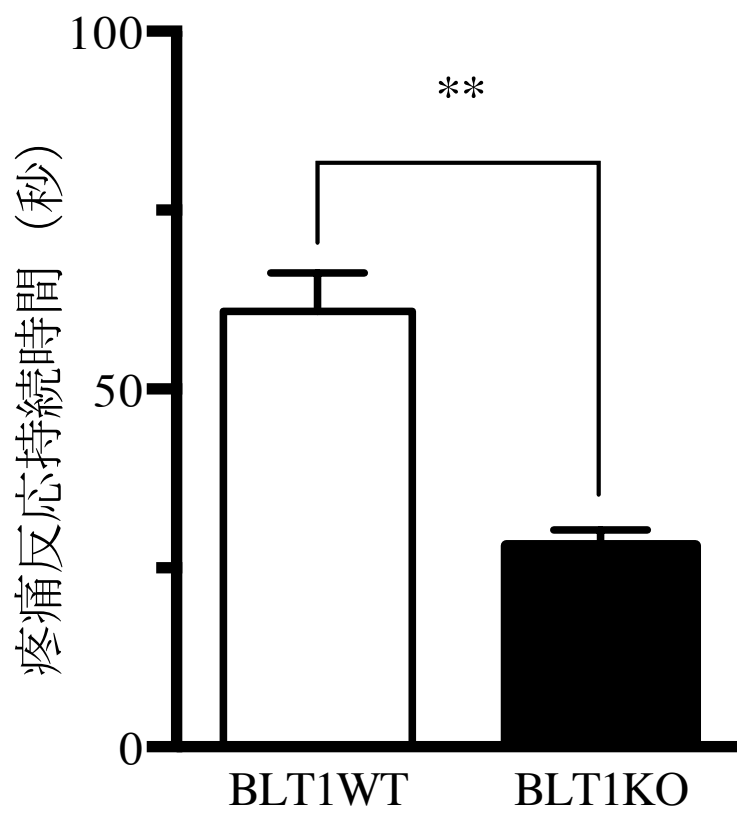


図5 カプサイシンテスト

BLT1WT: BLT1野生型マウス、BLT1KO : BLT1受容体欠損マウス

BLT1受容体欠損マウスでは、BLT1野生型マウスに比べて、疼痛反応が有意に抑制された(\*\* $p < 0.01$  vs. BLT1野生型マウス、 $n = 6$ )。

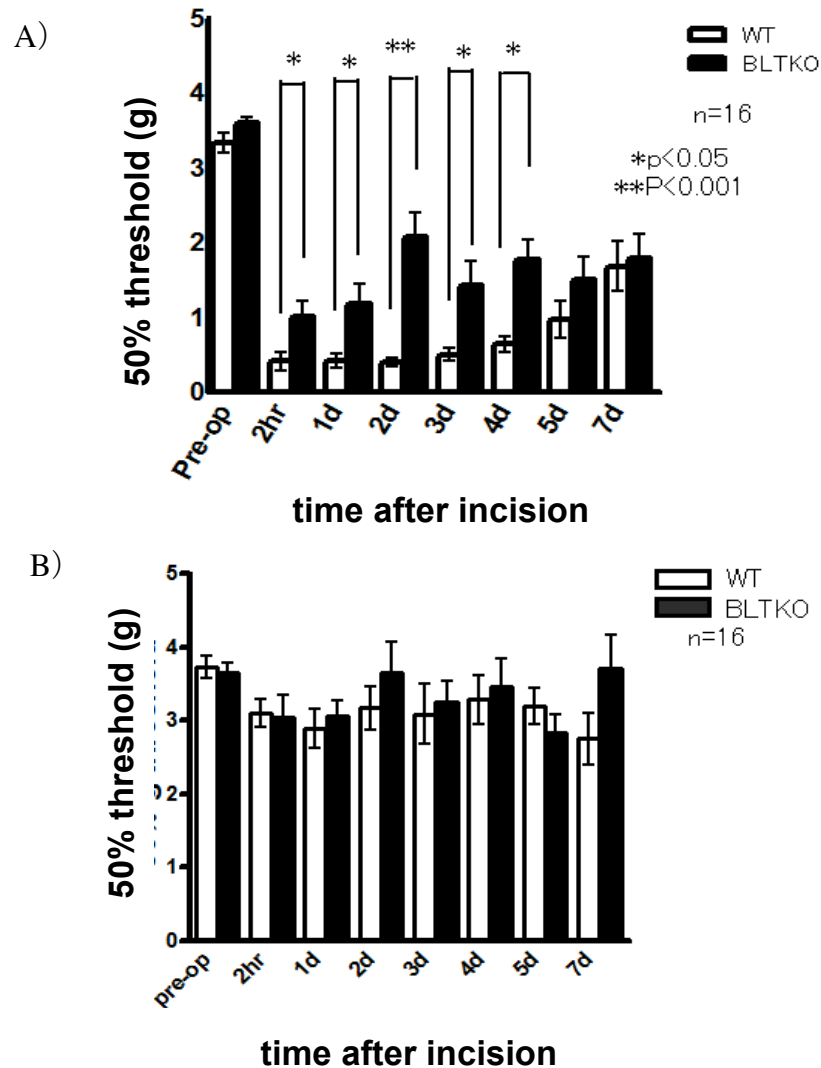


図6 術後痛モデル

-機械的刺激に対する逃避行動閾値の時間経過の比較-

BLTKO: BLT1 受容体欠損マウス WT: BLT1 野生型マウス

A) 切開側後肢、B) 非切開側後肢における、機械的刺激に対する逃避行動閾値を示した。

BLT1 受容体欠損マウスの切開側後肢では、BLT1 野生型マウスに比べて逃避行動閾値が有意に高値であった (\*p<0.05、\*\*p<0.01 vs. BLT1 野生型マウス、n = 16)。

## **BLT1 受容体欠損マウスにおける一次求心性線維の特性**

BLT1 野生型マウスと BLT1 受容体欠損マウスとの間で痛覚伝達経路上の一次求心性線維の特性に差があるか検討するため、いくつかの侵害受容神経のマーカーを用いて解析を行った。

まず免疫組織学的手法を用いて、naïve DRG ニューロンにおける TRPV1 及び CGRP の発現レベルを比較検討した。

図 7A・B には L4 DRG ニューロンにおける NeuN、TRPV1 及び CGRP 免疫染色像の代表的画像を示す。図 8 A・B に示すように、DRG ニューロンにおける TRPV1 及び CGRP 陽性率は、BLT1 受容体欠損マウスと BLT1 野生型マウスとの間に有意差はなかった (TRPV1:  $39.0 \pm 4.8\%$  vs.  $38.8 \pm 6.3\%$ 、CGRP:  $43.2 \pm 3.2\%$  vs.  $36.2 \pm 3.2\%$ )。

また、脊髄後角についても TRPV1 及び CGRP を用いた免疫染色を行い、どちらのマウスにおいても脊髄後角における TRPV1 および CGRP 陽性像を同様に確認した。代表的な TRPV1 及び CGRP 陽性像を NeuN 陽性像と共に図 9 に示した。

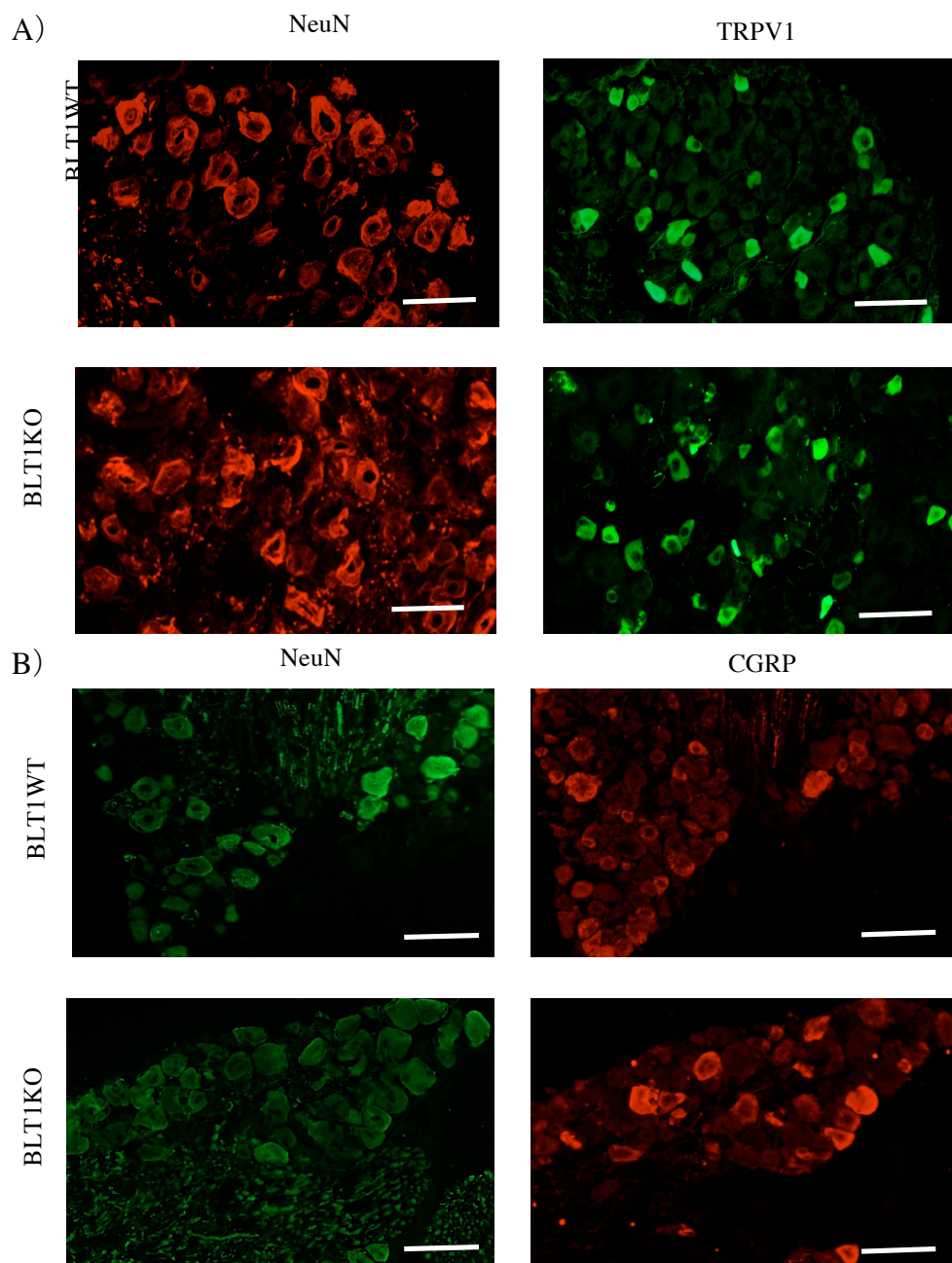


図7 L4 DRG における TRPV1 及び CGRP の発現 ([67]より改変)

BLT1KO : BLT1 受容体欠損マウス

BLT1WT : BLT1 野生型マウス

代表的な撮影画像 (scale bar 50μm)

A) TRPV1/ NeuN 及び B) CGRP/ NeuN 免疫染色

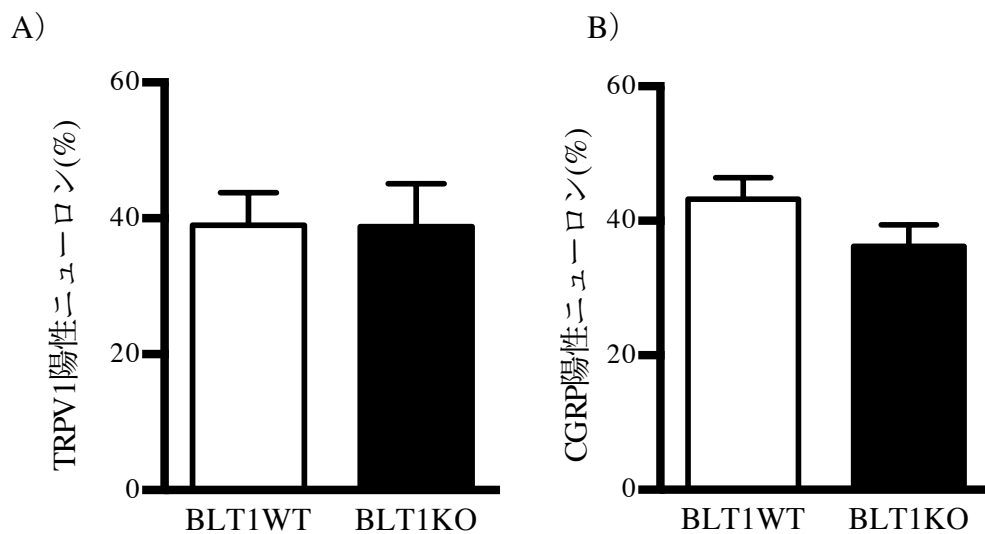


図8 L4 DRG における TRPV1 及び CGRP の発現量の比較  
([67]より改変)

BLT1KO : BLT1 受容体欠損マウス

BLT1WT : BLT1 野生型マウス

A) TRPV1 または B) CGRP 陽性率

BLT1 受容体欠損マウスの TRPV1 及び CGRP 陽性率は、  
BLT1 野生型マウスと比べていずれも有意差はなかった。

(1 匹あたりスライド 1 枚の観察)

(TRPV1 :  $p=0.9804$  vs. BLT1 野生型マウス、 $n=5$ 、

CGRP :  $p=0.1410$  vs. BLT1 野生型マウス、 $n=9$ )

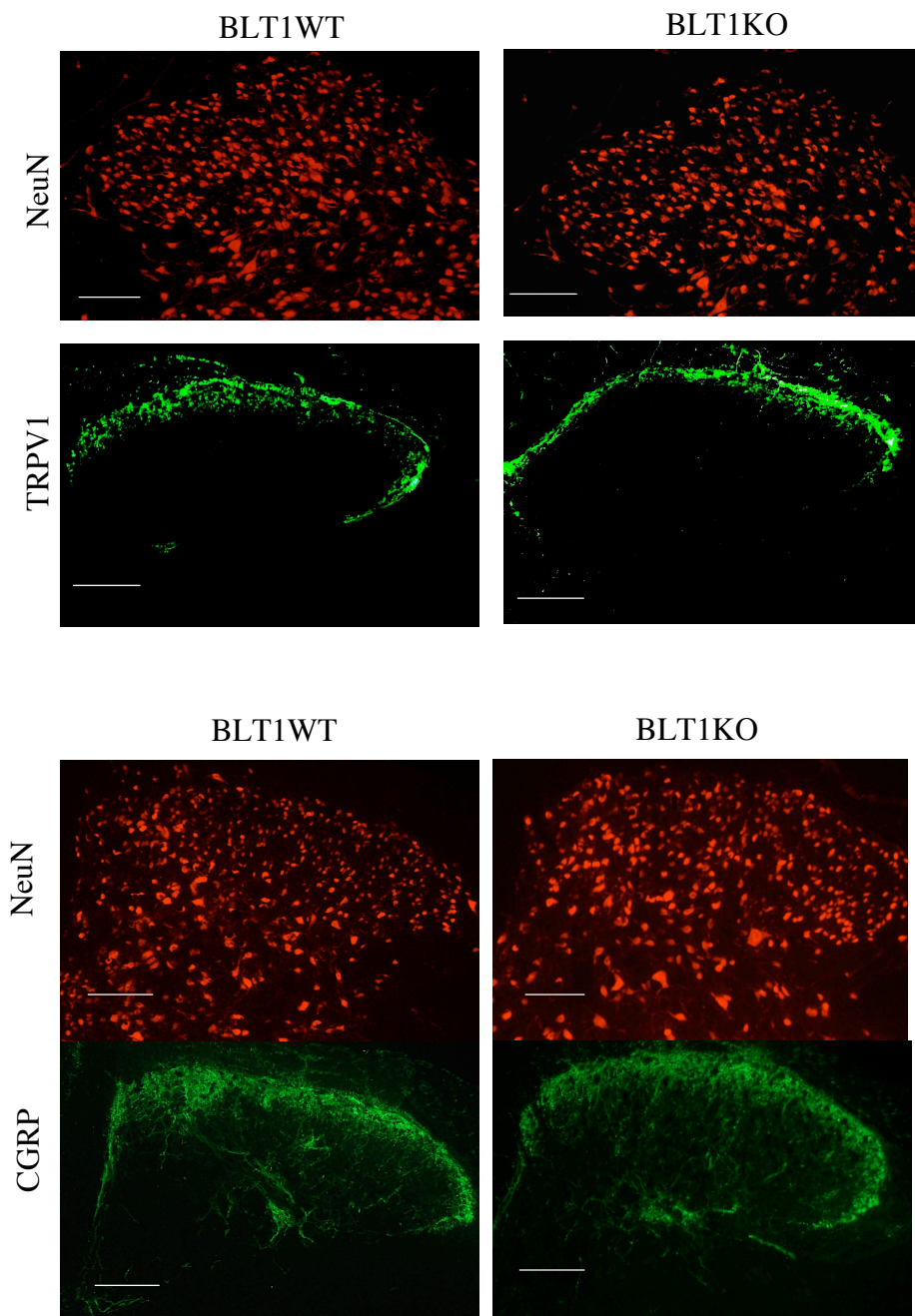


図9 腰部脊髄における NeuN、TRPV1、CGRP 免疫染色像 ([67]より改変)

BLT1WT : BLT1 野生型マウス、BLT1KO : BLT1 受容体欠損マウス  
 上段は NeuN/TRPV1、下段は NeuN/CGRP の二重染色像。  
 それぞれ代表的な撮影画像 (scale bar 100 $\mu$ m) を示した。



TRPA1 に関しては免疫染色で使用可能な抗体が現段階で入手不可能のため、リアルタイム PCR による検討を行った。TRPV1 についても同様の手法を用いて確認した。TRPA1 及び TRPV1 それぞれの mRNA の発現量を  $\beta$ -Actin の mRNA 発現量で除した値を相対的発現量として計算した。図 10 A～D に示すように、脊髄及び腰部 DRG における TRPA1 及び TRPV1 mRNA の相対的発現量は BLT1 受容体欠損マウスと BLT1 野生型マウスとで有意差がなかった。

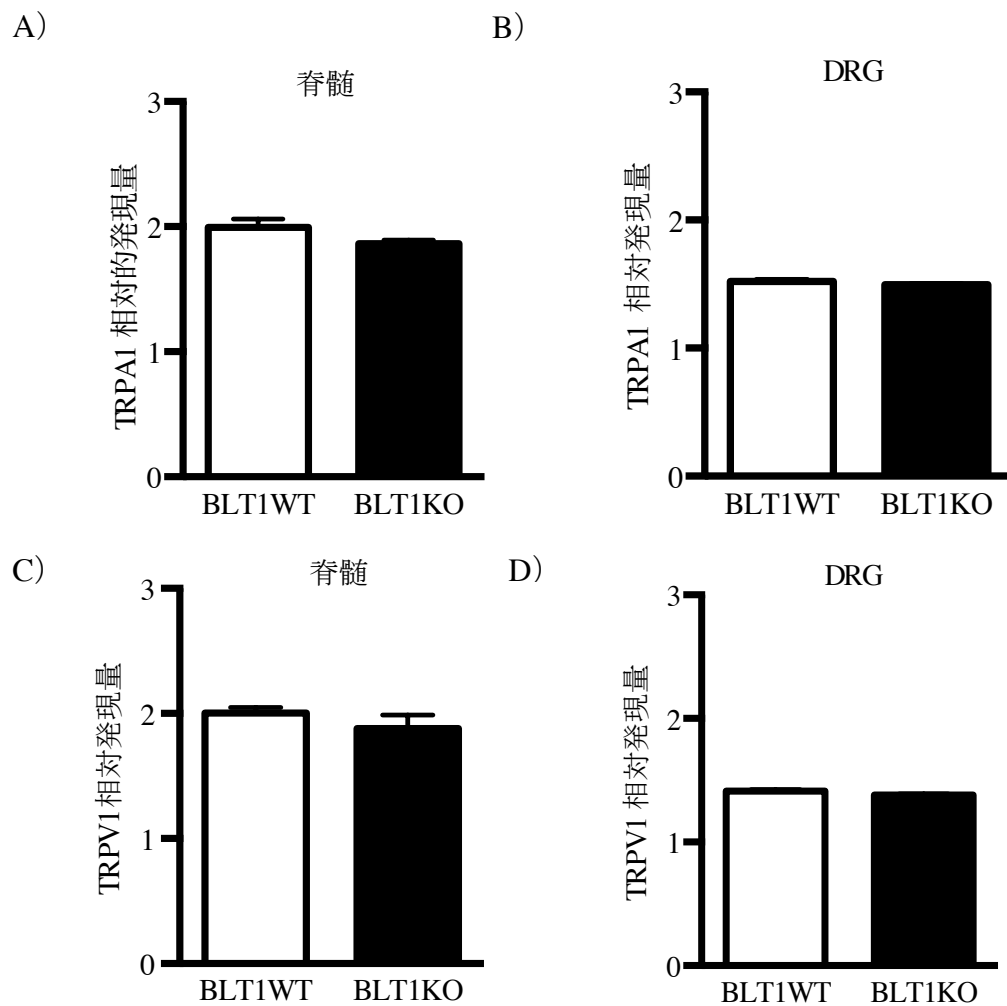


図 10 脊髓・DRG における TRPA1 及び TRPV1 mRNA 発現量の比較  
([67]より改変)

BLT1WT : BLT1 野生型 マウス、BLT1KO : BLT1 受容体欠損マウス

A)B)脊髓及び L4DRG における TRPA1 mRNA 相対発現量  
( $\beta$ -Actin で補正)

(脊髓:  $p=0.1313$ 、DRG  $p=0.1609$ 、vs. BLT1 野生型マウス、 $n=5-7$ )

C)D)脊髓及び L4DRG における TRPV1 mRNA 相対発現量  
( $\beta$ -Actin で補正)

(脊髓:  $p=0.3380$ 、DRG  $p=0.0582$ 、vs. BLT1 野生型マウス、 $n=5-7$ )

## 炎症反応の評価

### ホルマリン投与後の局所浮腫

ホルマリンテストの2nd phaseは、局所の炎症を契機に一次求心性線維の興奮が持続する結果引き起こされる中枢性感作に由来する痛み反応である[41]。一方でLTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルは炎症反応の増悪に重要な役割を果たしていることがわかっていて、そこで、BLT1受容体欠損マウスにおけるホルマリン投与後疼痛反応の減弱の背景に、局所の炎症反応が抑制されるとの仮説を立て、局所炎症反応の程度をBLT1野生型マウスと比較した。

局所炎症反応の指標として、ホルマリン投与1時間後の足蹠浮腫（足容積、血管透過性）及び局所好中球浸潤（MPO活性、フローサイトメトリー）を用いた。

ホルマリン投与後の足容積増加率は、図11A に示すようにBLT1受容体欠損マウスの方がBLT1野生型マウスに比べて有意に低値であった（ $p<0.05$ ）。また、図11Bに示すように、ホルマリンを足底投与されたBLT1野生型マウスの後肢では、vehicleを投与されたマウスの後肢に比べて血管透過性の亢進が認められた（ $p<0.05$ ）。このような有意な増加はBLT1野生型マウスにおいてのみ認められ、BLT受容体欠損マウスでは有意な亢進を認めなかった。

以上の結果から、LTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルを制御するとホルマリン足底投与後の局所の浮腫形成が抑制されることがわかった。

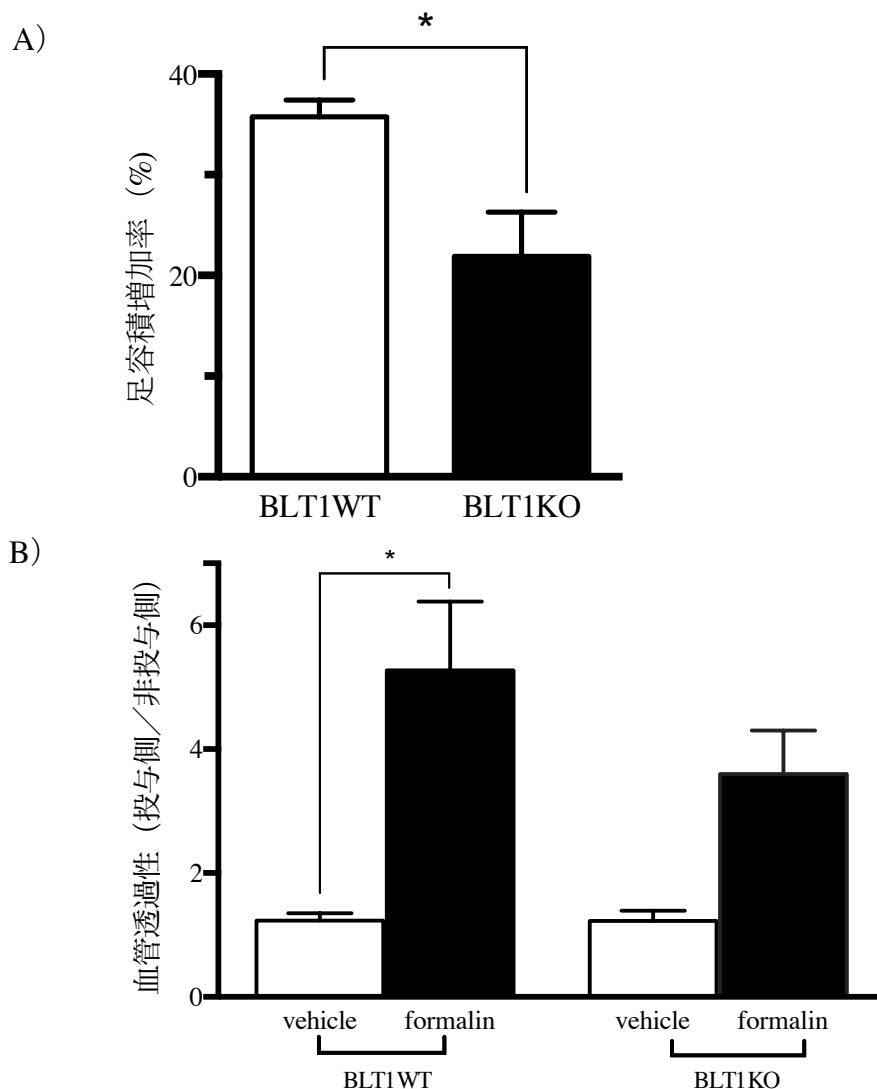


図 11 ホルマリン投与 1 時間後の足蹠浮腫の比較 ([67]より改変)

BLT1WT : BLT1 野生型マウス、  
BLT1KO : BLT1 受容体欠損マウス

A)足容積増加率

BLT1 受容体欠損マウスの方が有意に低値であった  
(\* $p < 0.05$  vs. BLT1 野生型マウス、 $n = 5$ )。

B)血管透過性

ホルマリンまたは vehicle を投与した側の後肢におけるエバンスブルー漏出量を非投与側後肢における漏出量で除した値を縦軸に示す。ホルマリンを投与した BLT1 野生型マウスでは、vehicle を投与したマウスに比べて血管透過性の有意な亢進がみられた ( $p < 0.05$ ,  $n = 5-7$ )。BLT1 受容体欠損マウスにおいても血管透過性の亢進を認めたが、有意な亢進ではなかった。ホルマリンを投与した BLT1 受容体欠損マウスと野生型マウスの血管透過性に有意差はなかった ( $p = 0.2366$ )

### ホルマリン投与後の好中球 MPO 活性

ホルマリン足底注射により局所に集簇した好中球数を評価するため好中球 MPO活性の測定を行った。

MPOは骨髄球及び単球に発現する酵素で、多核好中球浸潤のマーカーとして汎用されている。BLT1野生型マウスでは、ホルマリン投与側足蹠におけるMPO活性はBLT1受容体欠損マウスに比べて有意に増加していた ( $p<0.05$ )。非投与側は有意差を認めなかった (図12)。

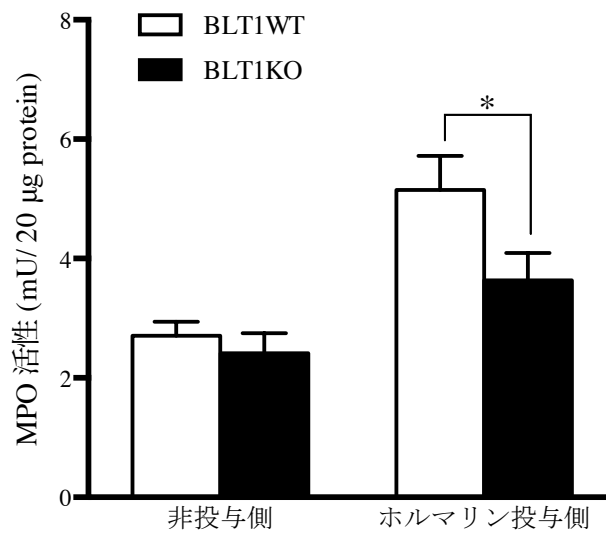


図 12 ホルマリン投与 1 時間後の足蹠組織 MPO 活性 ([67]より改変)

BLT1WT : BLT1 野生型マウス、

BLT1KO : BLT1 受容体欠損マウス

ホルマリン投与側足蹠の MPO 活性は、BLT1 受容体欠損マウスに比べて BLT1 野生型マウスの方が有意に高値となった

(\* $p < 0.05$ ,  $n = 8-9$ )。

非投与側は有意差がなかった。

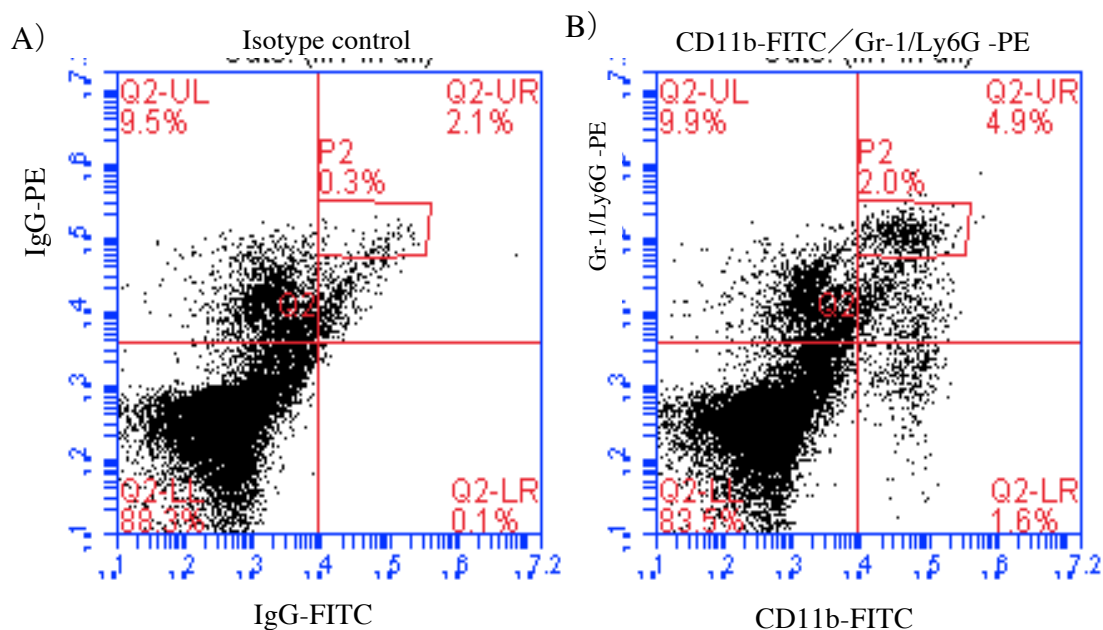
## フローサイトメトリー

フローサイトメトリーは、ホルマリン投与後に摘出した足蹠組織から調整した細胞浮遊液を用いて行った。好中球マーカーであるGr-1/Ly6G及びCD11bに対する抗体を用いて染色を行い、Gr-1/Ly6G及びCD11b共陽性の細胞を局所に集簇した好中球とみなした。その際、標識抗体と同一のアイソタイプコントロールをネガティブコントロールとした。BLT1野生型マウス、BLT1受容体欠損マウスそれぞれの代表的な染色結果を図13に示す。図14に示すように、足蹠組織細胞30,000個中の好中球数を算出したところ、BLT1野生型マウスではホルマリン非投与側足組織に比べて投与側組織で好中球の有意な増加が見られた

( $p<0.05$ )。BLT1受容体欠損マウスにおいても非投与側に比べて投与側の足の方が好中球は増加したが、有意な増加ではなかった。

以上の結果から、LTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルを制御するとホルマリン足底投与後の局所の浮腫形成及び好中球浸潤が抑制されることがわかった。LTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルは、ホルマリン足底投与後の局所の炎症反応を増強させ、疼痛反応を遷延化させる可能性が示唆された。

<BLT1 野生型マウス>



<BLT1 受容体欠損マウス>

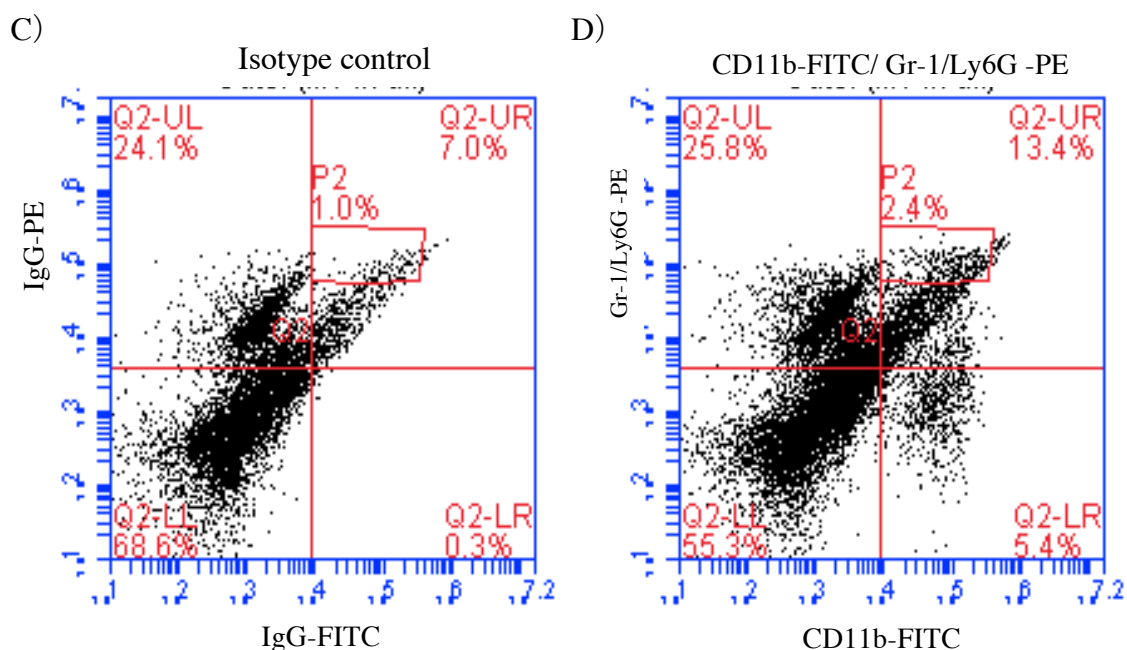


図 13 ホルマリン投与 1 時間後の足蹠組織 フローサイトメトリー結果

A)C)標識抗体と同一のアイソタイプコントロール  
(ネガティブコントロール)

B)D) CD11b-FITC / Gr-1/Ly6G-PE 抗体  
(Gr-1/Ly6G、CD11b は好中球表面抗原のマーカ)

上段は BLT1 野生型マウス、下段は BLT1 受容体欠損マウスの  
代表的な染色結果を示す。



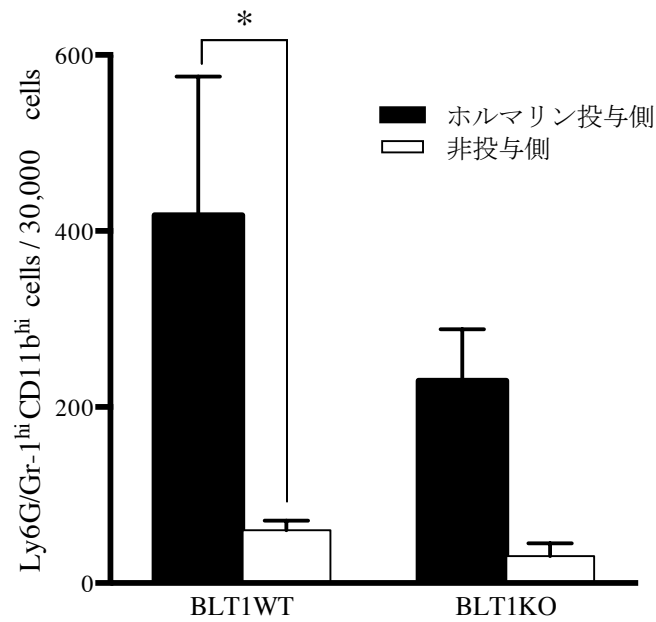


図 14 フローサイトメトリー  
 BLT1WT : BLT1 野生型マウス、  
 BLT1KO : BLT1 受容体欠損マウス

縦軸は足蹠組織の細胞 30,000 個中に含まれる Gr-1/Ly6G・CD11b 共陽性細胞数（局所に集簇した好中球数）を示す。

BLT1 野生型マウスのホルマリン投与側足蹠では非投与側に比べて好中球数の有意な増加がみられた ( $p<0.05$ ,  $n=5$ )。

BLT1 受容体欠損マウスにおいても、ホルマリン投与側足蹠において好中球数が増加したが、非投与側に比べて有意な増加ではなかった。

## 転写因子 CREB の活性化に与える影響

### ホルマリン足底投与後の脊髄後角でのCREBリン酸化の減弱

ホルマリン足底投与による中枢性感作にLTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルがいかに関与するかを解明するため、脊髄後角におけるCREBの活性化（リン酸化）を中枢性感作の指標として検討した。

CREB は様々なキナーゼの存在下に 133 番目のセリン残基がリン酸化されることで活性化すなわち転写活性が誘導され、cFos、COX-2 (Cyclooxygenase)、TrkB などの immediate early genes の転写を促進する。これにより脊髄後角ニューロンの感作、持続的な痛覚過敏状態が生じる[19]。免疫組織学的手法を用いて、ホルマリン投与 20 分後の両側脊髄後角におけるリン酸化 CREB (pCREB) の発現を確認した。脊髄後角における pCREB 抗体を用いた免疫染色の代表的な画像を図 15 に示す。

図16A、Bに示すように、BLT1受容体欠損マウスにおいてはホルマリン投与側の脊髄後角pCREB陽性ニューロン数はBLT1野生型マウスに比べて有意に低値であった ( $p<0.0001$ )。ホルマリン非投与側においても同様の所見が得られた ( $p<0.0001$ )。LTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルの制御はホルマリン投与後の脊髄後角におけるCREB活性化を抑制することで中枢性感作を減弱させる可能性が示唆された。

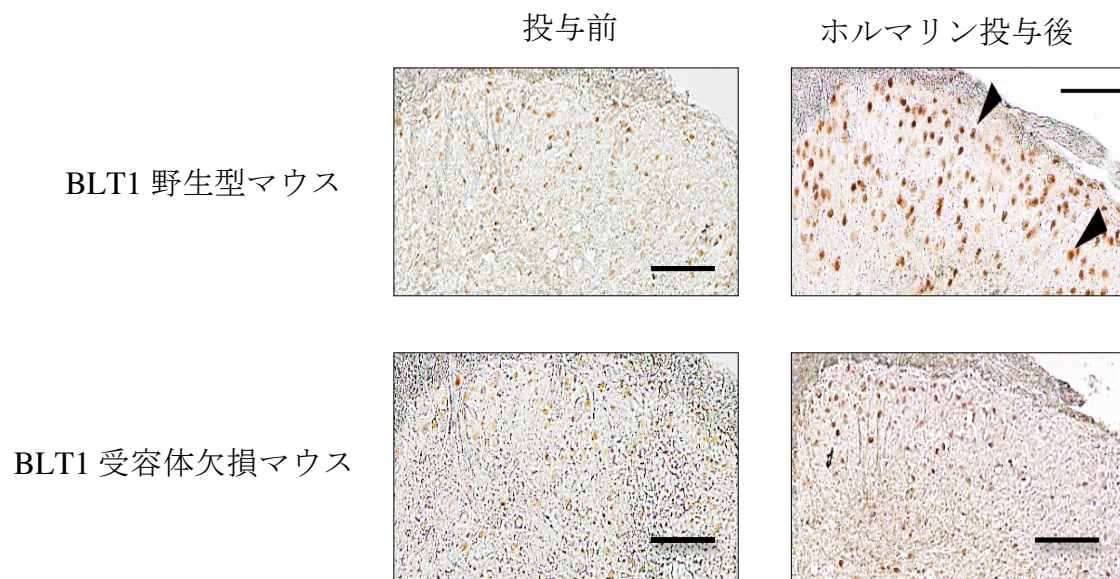


図 15 ホルマリン投与前/ 20 分後の脊髓後角における pCREB の発現  
([67]より改変)

ホルマリン投与側脊髓後角の免疫染色代表的画像を示す。

◀は pCREB 陽性像、scale bar 100μm

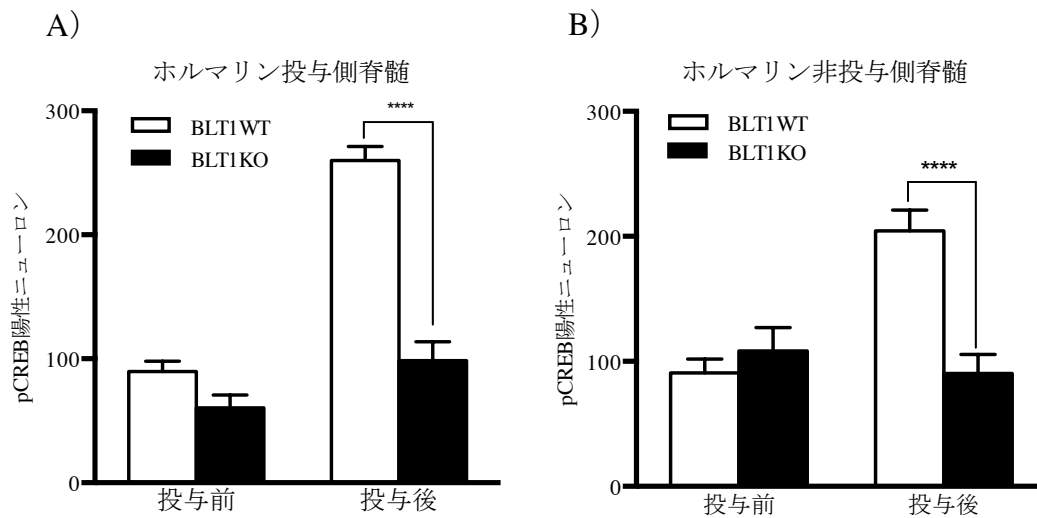


図 16 ホルマリン投与前/ 20 分後の脊髄後角における pCREB の発現  
([67]より改変)

BLT1WT : BLT1 野生型 マウス  
BLT1KO : BLT1 受容体欠損マウス

A) ホルマリン投与側及び B) 非投与側脊髄後角における  
投与前及び投与 20 分後の pCREB 陽性ニューロン数(1 匹あたりスライド  
1 枚の観察、各群 6 匹の平均値)を縦軸に示す。  
両側脊髄後角において pCREB の発現は BLT1 受容体欠損マウスで有意に  
抑制されていた。 (\*\*\*\* $p < 0.0001$  vs. BLT1-野生型マウス、 $n=6$ )

### カプサイシン足底投与後の脊髄広角での CREB リン酸化の減弱

カプサイシン足底投与後の脊髄後角でのCREBの活性化及び中枢性感作誘導についての報告がある[26] [27]ことから、ホルマリン同様免疫組織学的手法を用いて、脊髄後角におけるpCREBの発現について検討した。

カプサイシン投与側の脊髄後角のpCREB陽性像の代表的な画像を図17に示す。図18A、B に示すように、BLT1受容体欠損マウスにおいては、BLT1野生型マウスに比べて、カプサイシン投与側の脊髄後角でのpCREB陽性ニューロン数が有意に低値であった。非投与側においても同様の所見が得られた (\*\* $p < 0.001$ 、\*\*\*\* $p < 0.0001$ )。

LTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルはカプサイシン投与後の脊髄後角におけるCREB活性化を介して中枢性感作に関連することがわかった。

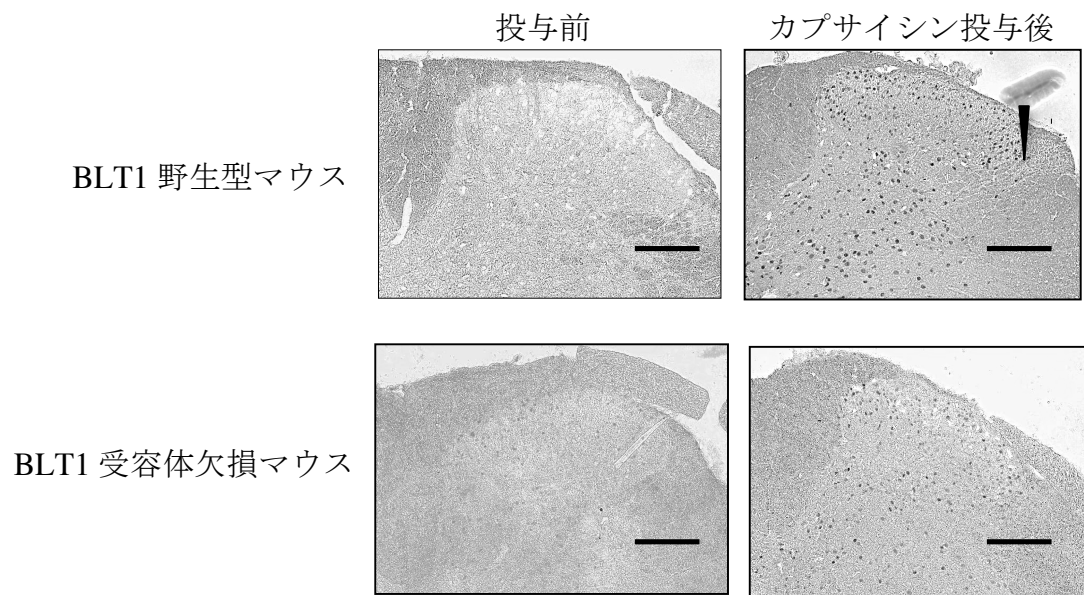


図 17 カプサイシン投与前/15 分後の脊髓後角における pCREB の発現  
 カプサイシン投与側脊髓後角の免疫染色代表的画像を示す。  
 ▼ は pCREB 陽性像、scale bar 100 $\mu$ m

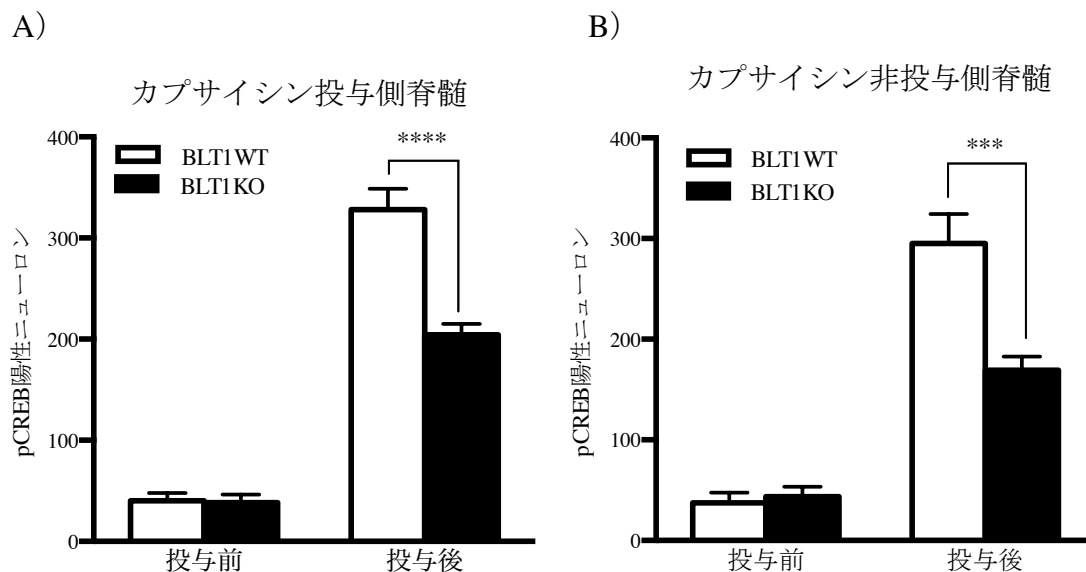


図 18 カプサイシン投与前／15 分後の脊髄後角における pCREB の発現  
 BLT1WT : BLT1 野生型 マウス  
 BLT1KO : BLT1 受容体欠損マウス

A) カプサイシン投与側及び B) 非投与側脊髄後角における  
 投与前及び投与 15 分後の pCREB 陽性ニューロン数  
 (1 匹あたりスライド 1 枚の観察、各群 4-6 匹の平均値)を縦軸に示す。

両側脊髄後角において pCREB の発現は、BLT1 受容体欠損マウスで  
 有意に抑制されていた。

(\*\*\*\* $p < 0.0001$ 、\*\*\* $p < 0.001$  vs. BLT1 野生型マウス、 $n=4-6$ )

## **BLT1 受容体拮抗薬 ONO-4057 の疼痛減弱効果**

野生型マウスに対するBLT1受容体拮抗薬ONO-4057の前投与がホルマリンテストの疼痛反応に及ぼす影響を検討した。またホルマリンがもたらす疼痛反応に、末梢から中枢までのどの部位のLTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルが重要なのか解明するため、全身投与としての腹腔内投与（i.p. : intraperitoneal）、局所投与としての足底投与（ipl. : intraplantar）、脊髄レベルとしてのくも膜下投与（i.t. : intrathecal）、と計3種の投与経路を用いて、vehicle投与マウスとの間で疼痛反応に与える影響を比較検討した。

ホルマリン足底投与による疼痛反応を投与直後より60分間にわたり観察した結果を図19A、C、Eに示す。どのマウスも2相性の疼痛反応を呈した。1st phase（0-10分後）及び2nd phase（11-60分後）とに分けて、各累積疼痛反応時間を計測した結果を図19B、D、Fに示した。1st phaseの累積疼痛反応持続時間はvehicle投与マウスと同程度だったが、2nd phaseは、ONO-4057を投与されたマウスの方がvehicleを投与されたマウスに比べて有意に減少した。そしてその疼痛反応減弱効果は、0.25mg 腹腔内投与、2.35 $\mu$ g足底皮下注射、または20 $\mu$ gくも膜下投与されたマウスにおいて有意に認められた。より低用量を投与されたマウス

（0.125mg腹腔内投与、0.014 $\mu$ g足底皮下注射、または10 $\mu$ gくも膜下投与）では、有意な疼痛反応減弱効果は認められなかった。以上の結果からLTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルは侵害刺激が加わる局所においてだけでなく、より上流の脊髄レベルにおいてもホルマリン投与後の疼痛の発生に関与する可能性が示唆された。



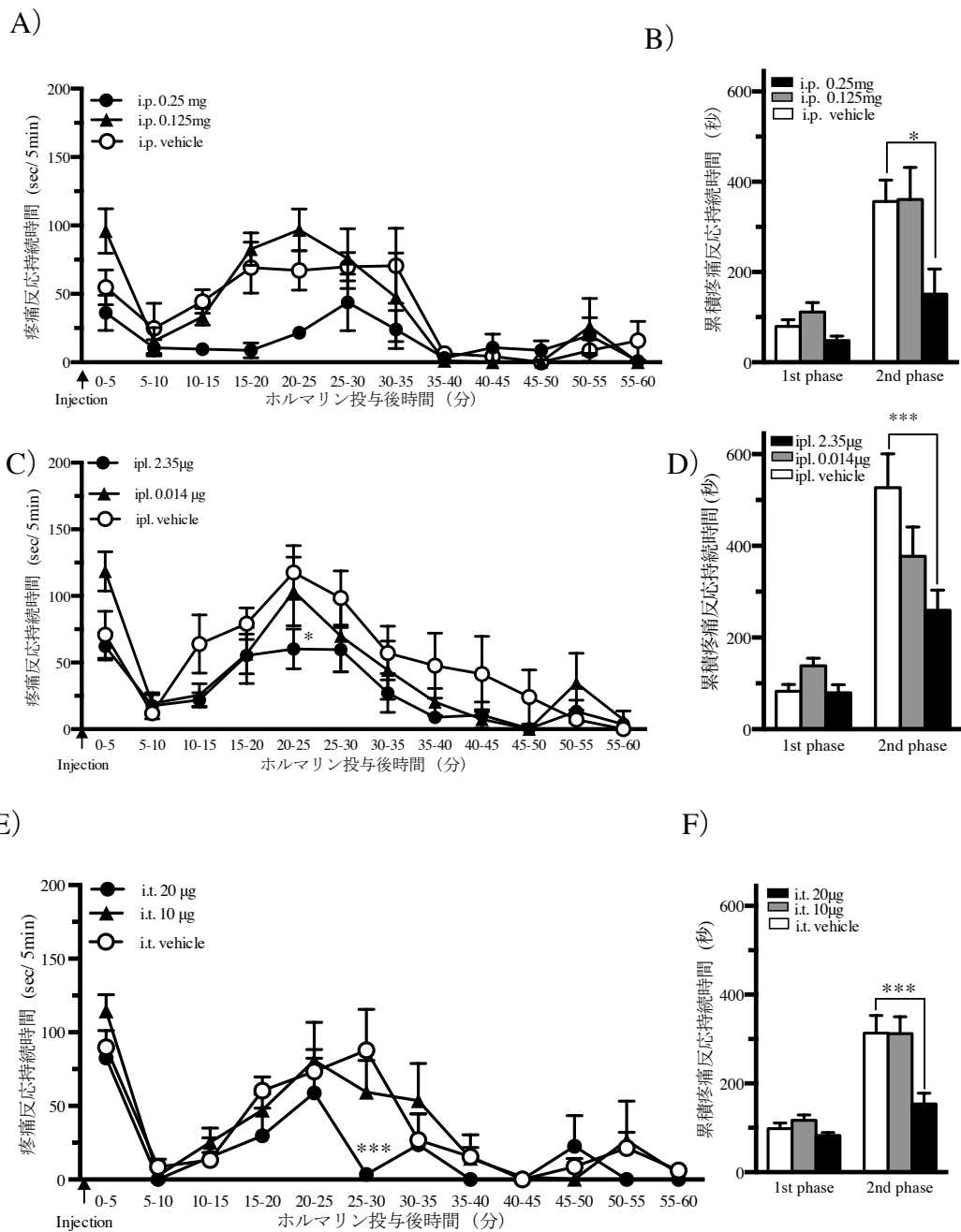


図 19 ONO-4057 によるホルマリンテストの疼痛反応減弱 ([67]より改変)

ONO-4057 の前投与により 2nd phase の反応が有意に減弱した。

A) B) 腹腔内投与 \* $p < 0.05$  vs. vehicle 投与マウス、

C) D) 足底局所注射 \* $p < 0.05$ 、\*\*\* $p < 0.001$  vs. vehicle 投与マウス

E) F) くも膜下投与 \*\*\* $p < 0.001$  vs. vehicle 投与マウス  $n=5-7$

## **ONO-4057が中枢性感作に与える影響**

野生型マウスを用いてONO-4057によるLTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルの抑制がホルマリン投与後の脊髄後角におけるpCREBの発現に与える影響を検討した。ONO-4057は、ホルマリン足底注射45分前に腹腔内投与（0.25mg/mouse）または足底局所注射（2.35μg/mouse）した。ホルマリン投与20分後に腰部脊髄を摘出して免疫染色を行った。

図20に示すように、ONO-4057の前投与は、全身投与（腹腔内投与）、局所投与（足底局所注射）いずれもvehicle投与マウスに比べて、脊髄後角におけるpCREBの発現を有意に減弱させた。脊髄レベルあるいは末梢レベルでのLTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルの抑制は、脊髄におけるCREBのリン酸化を阻害し中枢性感作を抑制する可能性が示唆された。

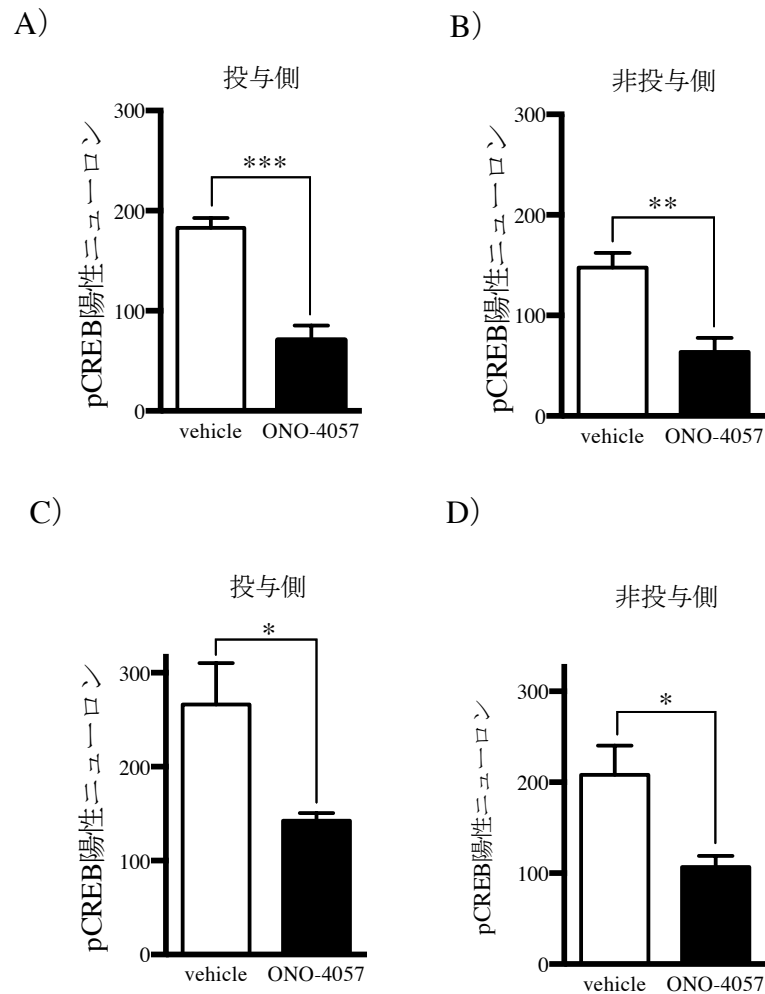


図 20 ONO-4057 投与マウスの脊髄後角 pCREB 発現抑制 ([67]より改変)

ONO-4057 腹腔内投与マウスの ホルマリン投与側 A) 及び非投与側 B) 脊髄後角における pCREB 陽性ニューロン数を縦軸に示す。  
(1 匹あたりスライド 1 枚の観察、各群 4-5 匹の平均値)

ONO-4057 前投与により両側脊髄後角における pCREB の発現が有意に抑制された (\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  vs. vehicle 投与マウス、 $n=5$ )

また、ONO-4057 足底注射マウスのホルマリン投与側 C) 及び非投与側 D) 脊髄後角における pCREB 陽性ニューロン数を縦軸に示す。  
(1 匹あたりスライド 1 枚の観察、各群 5 匹の平均値)

ONO-4057 前投与により両側脊髄後角における pCREB の発現が有意に抑制された。(\* $p < 0.05$  vs. vehicle 投与マウス、 $n=5$ )

## 6. 「考察」

### BLT1 受容体欠損マウスの疼痛反応の表現型

BLT1受容体欠損マウスにおける疼痛反応の表現型について、3つの急性痛モデルを用いて検討した。第一に、ホルマリンテストは、ホルマリン足底投与の結果2相性の疼痛反応をきたす急性痛モデルである。1st phase（投与直後から投与10分後まで）の疼痛反応はホルマリンによる侵害受容器の直接刺激に起因し、2nd phase（投与10分後以降）はホルマリン注入部位局所で進行する炎症・組織障害ならびに1st phaseでの一次求心性神経ニューロン活性化により惹起される脊髄後角の感作に起因するとされている[41]。また、ホルマリンによる一次求心性神経ニューロンの活性化は、ホルマリンのTRPA1受容体への直接作用によるとする報告[42]もある。図4に示すように、BLT1受容体欠損マウスではBLT1野生型マウスに比べて、1st phaseの反応は有意差がなかったが、2nd phaseの反応が有意に減弱した。この結果から、BLT1受容体欠損マウスでは、ホルマリンによる侵害受容器活性化を反映する1st phaseの疼痛反応は野生型マウスと差がないが、LTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルのブロックにより局所の炎症や脊髄後角の感作が減弱しているために2nd phaseの疼痛反応が軽減したのではないかと仮説を立てるに至った。

カプサイシンテストは、カプサイシン足底投与の結果疼痛反応を呈する急性痛モデルである。カプサイシン投与直後より、後肢をなめる・かむ・振り回すなどの行動が出現し5分間程度で消失する。この疼痛反応はカプサイシンが一次求心性繊維であるC繊維上のTRPV1受容体を直接活性化することに起因する。

図5に示すように、BLT1受容体欠損マウスではカプサイシン投与後の疼痛反応が有意に減少した。このことから、LTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルがTRPV1受容体を介した疼痛の発生に何らかの形で影響を及ぼしている可能性が考えられた。

また、術後痛モデルは、後肢足底切開を加える事で自発痛や機械的刺激に対する逃避閾値の低下（アロディニア）が一週間程度継続する疼痛モデルである。足底切開による組織損傷および局所の炎症が持続的な侵害受容器刺激をもたらし一次求心性神経が感作されると同時に、脊髄後角におけるミクログリアやアストロサイトが活性化し脊髄レベルでも可塑性変化をきたすとされている。図6に示すように、BLT1受容体欠損マウス、BLT1野生型マウス共に、切開前に比べて切開2時間後以降、機械的刺激に対する逃避閾値の低下が認められた。そしてBLT1受容体欠損マウスではBLT1野生型マウスに比べて逃避閾値の低下が有意に抑制された。LTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルが、後肢足底皮膚切開後の組織損傷・炎症に伴う一次求心性神経の持続興奮やその後の脊髄レベルでの可塑性変化に何らかの形で寄与する可能性が考えられた。

以上3つの疼痛モデルを用いた行動実験の結果、LTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルはホルマリンテスト2nd phaseの疼痛反応、カプサイシンテストの疼痛反応、及び足底切開後の機械刺激性痛覚過敏の発生維持などの病態に関連する可能性が示唆された。

## **BLT1 受容体欠損マウスにおける一次求心性線維の特性**

痛みは一次求心性線維のうち、主に有髄A $\delta$ 線維や無髄C線維の自由神経終末上の種々の侵害受容器が活性化される事によって生じる。この侵害受容器の一つに、温度や様々なchemical mediatorに反応するtransient receptor potential (TRP) チャンネルが存在する。TRPチャンネルの中で侵害受容に深く関わっているのが TRPA1・TRPV1の2つのチャンネルで、一次知覚ニューロン（主にC線維）上に発現し炎症性疼痛の発生と強い関連性が示されている[43] [44]。TRPV1、TRPA1が刺激されると侵害受容器の疼痛閾値の低下（末梢性感作）が起こって疼痛が増強する[43] [45,46]。またその結果一次求心性神経終末からグルタミン酸、サブスタンスPなどの放出が増加して、脊髄後角細胞が微弱な刺激に対しても過剰に反応する状態（中枢性感作）が引き起こされる[47]。ホルマリンはTRPA1への直接作用を介して一次知覚ニューロンを興奮させる事が示されているが[42]、TRPチャンネルの発現が確認されているC線維を焼灼してもホルマリンによる疼痛反応は残存するとの報告[48]があることから、TRPA1以外の侵害受容器も関与している可能性がある。またカプサイシンによる自発痛は先述のようにTRPV1受容体の直接刺激によるものである[26,27]。そこで、本研究では、図7-10に示したように、naïve BLT1受容体欠損マウスのDRGニューロンおよび脊髄後角ニューロンにおいて、TRPA1とTRPV1の発現が野生型マウスと同程度であることを確認した。また、A $\delta$ 線維及びC線維の双方に発現するCGRPについても検討し、両マウスの間で差がない事を確認した。以上の結果はBLT1受容体欠損マウスにおけるホルマリン由来の疼痛反応の減弱が侵害受容ニューロンの特性の違いによるものではない事を示している。

## ホルマリン投与後の末梢炎症反応抑制

LTB<sub>4</sub>の主たる作用は、LTB<sub>4</sub>の高親和性BLT1受容体への結合により生じる強力な白血球遊走作用である。BLT1受容体欠損マウスやBLT1受容体拮抗薬を用いた過去の研究では、BLT1を介したLTB<sub>4</sub>シグナルの阻害により関節リウマチや腸炎、乾癬など種々の炎症疾患モデルにおいて、炎症に伴う諸症状の改善とともに炎症局所への好中球浸潤を抑制することが示されている[7] [12] [49] [13]。

LTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルはまた多形核好中球の活性化を介して血管透過性を亢進させる事も示されている[50]。本研究では、BLT1受容体欠損マウスにおいて、図11Aに示したようにホルマリン足底注射後の足容積増大が認められ、図11Bにあるように血管透過性の有意な亢進をきたさなかったことで、足浮腫形成が抑制される事がわかった。また図12に示したように局所におけるMPO活性の増加抑制とともに、図13、14にあるようにフローサイトメトリーの結果、BLT1野生型マウスで認められた局所の有意な集簇好中球の増加がBLT1欠損マウスでは認められないとの結果を得た。MPO活性の増加は好中球活性化による脱顆粒を反映している。また、組織学的手法を用いた検討によりホルマリン足底投与後早期は肥満細胞の脱顆粒が主で、24時間後以降に著明な好中球浸潤がみられたとする報告[51]がある他、ホルマリン投与後の局所において炎症反応の維持増悪にかかわる免疫細胞の役割、意義についてはこれまであまり報告がない。本研究では、ホルマリン足底投与60分後という比較的早期の段階で、局所において好中球の集簇及び活性化が生じ、それらはBLT1受容体欠損マウスにおいて抑制されている事がわかった。LTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルはホルマリン局所注射後の末梢局所

の浮腫形成や好中球集簇及び活性化といった炎症反応を促進させることで、疼痛反応増悪に関連する可能性が示唆された。

### LTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルによるTRPV1受容体活性の修飾の可能性

LTB<sub>4</sub>をはじめとする脂質メディエーターは、TRP チャンネルを内因性に活性化すると報告[52] [53] [54]があり、LTB<sub>4</sub>は炎症状態において内在性リガンドとしてTRPV1受容体に結合可能とされている。しかし、一般にTRPチャンネルの活性化にはμMレベルという非常に高濃度の脂質メディエーターが必要との報告[55]があり、LTB<sub>4</sub>がTRPV1 の内因性リガンドとなりうるかどうかは議論が分かれるところである。同じく疼痛の発生に強く関連し一次知覚神経細胞上に発現するプロスタノイド受容体EP4 [56]、EP1、IP [57]などのGPCRがTRPV1受容体の応答性を増強させることを鑑みると、同じGPCRであるBLT1もまたTRPV1受容体の機能を修飾し、疼痛の増強に関与している可能性も考えられる。ブラジキニン、ATP、トリプターゼなどの炎症性メディエーターは、PKC[55,58,59]あるいはPKA[60,61]の活性化を介して、DRGニューロンにおけるTRPV1受容体の応答性を増強させる事が知られている。

AndohらによるCa<sup>2+</sup>イメージングを用いた検討の結果、LTB<sub>4</sub>はTRPV1陽性DRGニューロンの細胞内Ca<sup>2+</sup>を増加させたこと[62]から、侵害受容ニューロン上に存在するBLT1受容体を介したLTB<sub>4</sub>のシグナルが、TRPV1受容体の活性化に何らかの形で関連しているのかもしれない。ホルマリンあるいはカプサイシン投与による侵害刺激が加わった直後に末梢局所でLTB<sub>4</sub>が産生され、BLT1あるいは



TRPV1チャネルの両方を発現する一次知覚神経が活性化されて疼痛増強に関連したとも考えられる。あるいはBLT1受容体欠損マウスではTRPV1受容体の応答性が野生型マウスと異なる可能性もあるかもしれない。LTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルとTRPV1の活性化との関連については、更なる検討が必要である。

### **BLT1 受容体拮抗薬 ONO-4057 の疼痛減弱効果について**

BLT1 受容体欠損マウスで認められた疼痛軽減効果が LTB<sub>4</sub>-BLT1 シグナルの欠損によるものであるか、どの部位の LTB<sub>4</sub>-BLT1 シグナルが急性痛の病態に最も重要な役割を果たしているのかを解明するために行った。BLT1 受容体拮抗薬である ONO-4057 が疼痛に及ぼす効果についての文献報告が入手できなかった。従って、ONO-4057 の投与により脊髄損傷モデル動物に対する脊髄内の炎症細胞浸潤を抑制したとの報告[39]及び LTB<sub>4</sub>皮内注射による痒みが減弱したとの報告[38]を参考にして腹腔内投与・足底注射について2種類の投与量を設定した。くも膜下投与については参考にできる文献報告がなかったため、投与量を腹腔内投与の投与量の約10分の1程度に設定し実験を行った。どの投与経路においても高用量投与群では疼痛減弱効果が認められたが、低用量投与群では vehicle 投与群とほぼ同程度の疼痛反応が観察され、疼痛減弱効果を全く認めなかった。ONO-4057 の疼痛減弱効果に用量依存性があるかどうかについては、さらに別の投与量での疼痛行動実験を施行して詳細に検討する必要がある。

## ホルマリンあるいはカプサイシン足底投与後の中枢性感作との関連

脊髄後角における転写因子CREBの活性化は侵害刺激に対する脊髄後角ニューロンの興奮性増大を反映し、中枢性感作すなわち中枢神経の可塑性変化のトリガーとなりうる。BLT1受容体欠損マウスにおいては、図15-18に示すように、ホルマリン及びカプサイシン投与後の脊髄におけるCREBの活性化の有意な減弱を認めた。片足への炎症性物質の投与にもかかわらず両側の脊髄後角においてCREBの活性化が起こること[25]が報告されており、今回の検討の結果はこれに矛盾しないと考えられる。LTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルは、末梢組織に対する侵害刺激により誘導される中枢性感作の発生においても重要な役割を果たす事が示唆された。

## LTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルの脊髄レベルでの痛覚伝達への寄与

本研究により得られた重要な知見として、LTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルの制御と脊髄後角ニューロンにおけるCREB活性化の抑制との関連があげられる。脊髄後角ニューロンにおけるCREB活性化は、持続的な痛覚過敏を引き起こすのに重要な役割を担う遺伝子の転写活性を促進して、疼痛の増強に関与する。脊髄におけるCREBの活性化にはERKなどのキナーゼの活性化が重要である[19]。LTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルによるERKの活性化の機序として、一つは末梢の炎症に伴い一次知覚神経を刺激する結果起こる脊髄ニューロンでのERKの活性化、もう一方は脊髄ニューロンにおいてBLT1を介したLTB<sub>4</sub>シグナルがERKを直接活性化し、引き続いてCREBが活性化する、という2つの機序が考えられる。図19に示すように、

BLT1受容体拮抗薬投与マウスにおけるホルマリン由来の疼痛反応は、1st phaseについてはvehicle投与マウスと同程度であったが、2nd phaseの反応は減弱した。そしてこの疼痛反応減弱効果は、腹腔内投与だけでなく、末梢局所投与あるいはくも膜下投与においても同様に認められた。また、図20に示したように腹腔内投与、足底注射によるBLT1受容体拮抗薬の前投与は、vehicleに比べてホルマリン注射後の脊髄後角におけるCREBの活性化が有意に減弱していた。BLT1受容体拮抗薬のくも膜下投与が有効であったことから、脊髄ニューロン上で、BLT1を介したLTB<sub>4</sub>シグナルが直接ERK-CREBカスケードを活性化した可能性が考えられる。Okuboらは、末梢神経損傷モデルラットにおいて、脊髄後角ニューロンでのBLT1 mRNAの発現が増強する事、またBLT1受容体拮抗薬あるいは5-LOX阻害薬のくも膜下投与によりアロディニアが改善すると報告している[17]。従って、LTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルは、脊髄レベルでホルマリン投与後の疼痛反応増強に関連しているものと推察された。

またLTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルは脊髄後角ニューロンにおけるシナプス電流を直接修飾する事で、中枢性感作を一部修飾しているのかもしれない。アラキドン酸カスケード由来の脂質メディエーターの中で、プロスタグランジンE<sub>2</sub>はEP2受容体を介して脊髄後角ニューロンにおける興奮性シナプス後電流を増強するが[63]、血小板活性化因子（PAF: platelet-activating factor）は何の変化も生じなかったと報告されている[64]。LTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルが興奮性シナプス後電流に与える影響については、更なる電気生理学的検討が必要である。

末梢局所における炎症反応は脊髄後角に存在するアストロサイトの活性化を誘導し、またホルマリンテスト2nd phaseの反応はグリア細胞の機能阻害により

減弱するとの報告がある[65] [66]。グリア細胞はプロスタグランジンや様々な炎症性サイトカインを分泌することから、プロスタグランジンと同じ炎症性脂質メディエーターであるLTB<sub>4</sub>もグリア細胞から分泌され、脊髄ニューロン上のBLT1受容体に結合し、ERKの活性化ならびにCREBのリン酸化を誘導し、中枢性感作に寄与するという仮説が考えられる。この仮説の検証のためには細胞レベルでのより詳細な検討が必要である。

### 本研究の限界と今後の課題

BLT1受容体欠損マウスを用いた疼痛行動実験の結果、LTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルの制御によりホルマリン足底投与後の疼痛反応が減弱することがわかった。また、ホルマリン足底投与後に脊髄後角におけるCREBの活性化が減弱する事を示した。脊髄後角におけるCREBの活性化は脊髄後角ニューロンの興奮性増大を反映するため、CREB活性化の減弱は持続的な疼痛シグナル入力により誘導される中枢神経の可塑性変化（中枢性感作）の抑制を反映するものとみなせる。またホルマリンテスト後の局所における炎症反応（浮腫形成、好中球集簇、好中球活性化）が抑制されることを示した。さらに拮抗薬を用いたLTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルの阻害により、ホルマリンテスト2nd phaseの疼痛減弱及び中枢性感作の抑制を認めた。これらの疼痛反応減弱及び中枢性感作の抑制効果は、BLT1受容体拮抗薬の全身投与だけでなく局所投与、あるいはくも膜下投与によっても認められた。

以上から、図21に示すようにホルマリンによる局所組織障害に伴う疼痛の発生維持には、局所および脊髄、両方のレベルでLTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルが寄与する可能性が示唆された。

ホルマリン足底注射後の局所あるいは脊髄においてLTB<sub>4</sub>がどの程度産生されるのかについてはLTB<sub>4</sub>の定量実験が必要だが技術的に困難であり断念した。

なお、LTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルの脊髄レベルでの作用解明のためには、先述したようにLTB<sub>4</sub>の産生細胞の確認、作用点などについて細胞レベルでの実験が必要である。またLTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルと脊髄後角シナプス電流との関連性については電気生理学的手法を用いた検討が必要である。

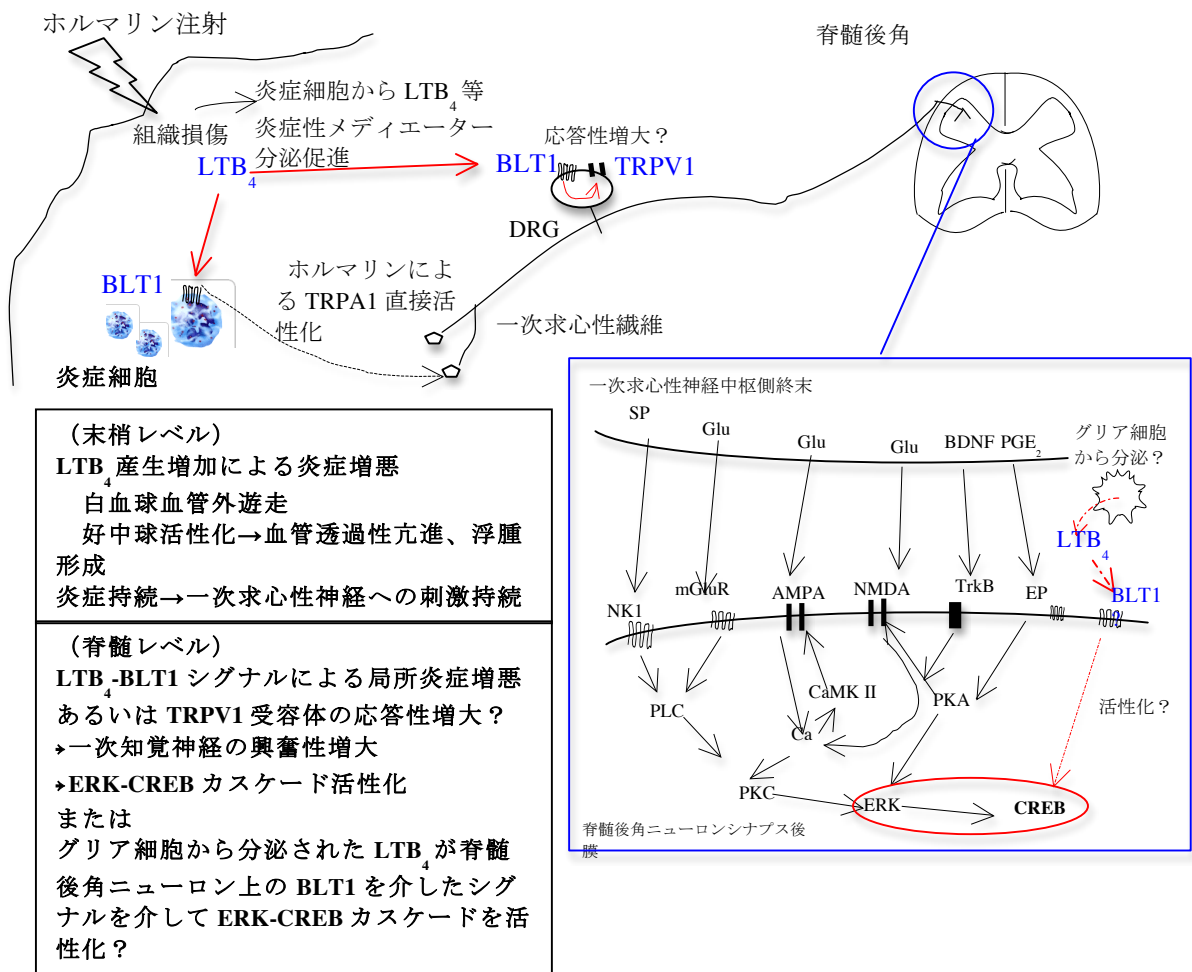


図 21 ホルマリンテストの疼痛反応における  $LTB_4$ -BLT1 シグナルの寄与

一方、カプサイシンテストにおいては、 $\text{LTB}_4$ -BLT1シグナルの阻害により投与後5分間の疼痛反応の有意な減弱及び脊髄後角におけるCREBの活性化減弱を認めた。カプサイシン投与直後の疼痛反応はTRPV1受容体の直接活性化を介した一次知覚神経の興奮によるものであることから、図22に示すように $\text{LTB}_4$ -BLT1シグナルがTRPV1受容体になんらかの修飾を及ぼして疼痛反応の増悪、あるいは中枢性感作の発生に寄与している可能性が考えられた。今後カルシウムイメージングなどを用いたより詳細な実験が必要である。ホルマリンテストと同様の理由で、局所あるいは脊髄における $\text{LTB}_4$ の定量実験は施行できなかった。

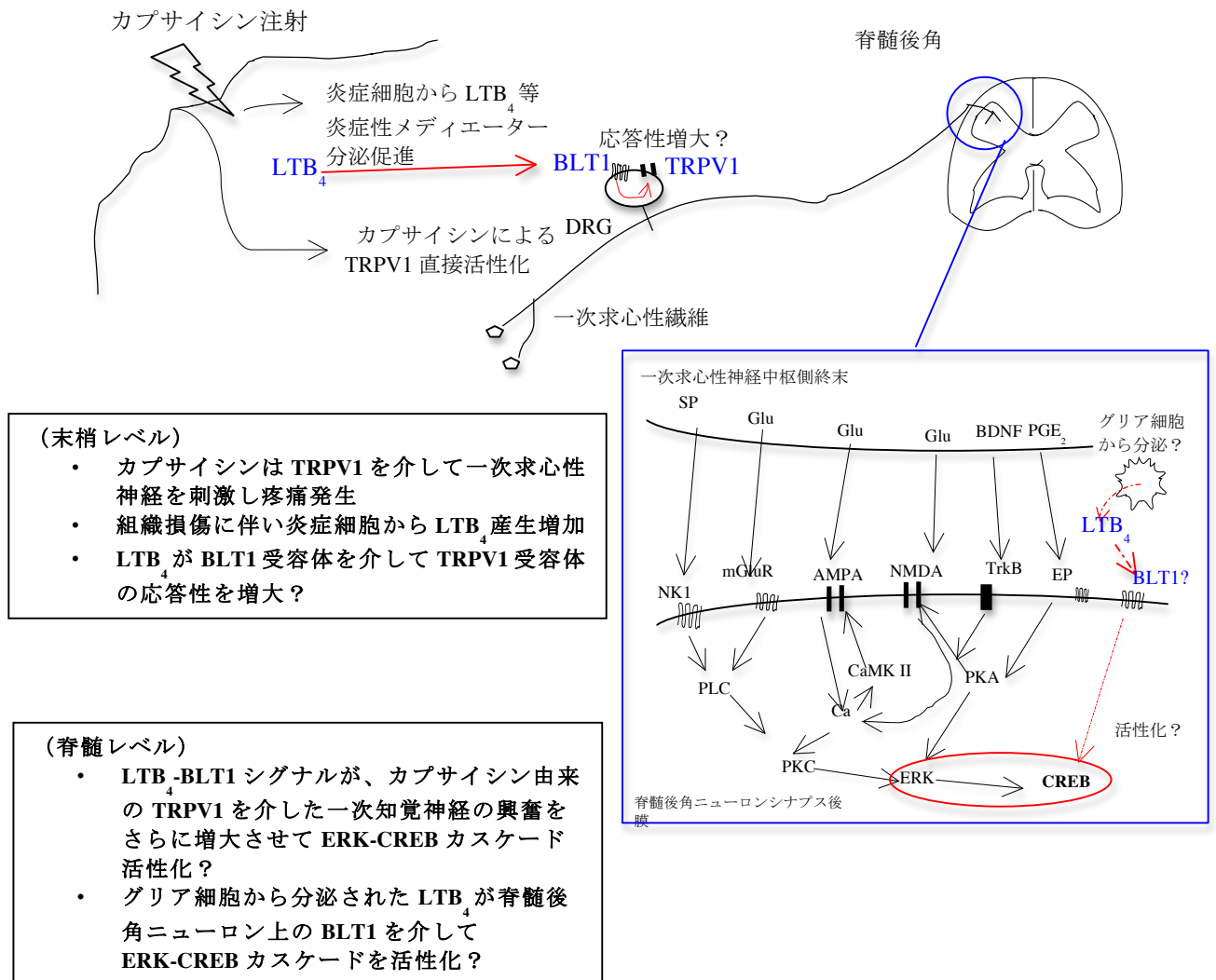


図 22 カプサイシンテストの疼痛反応における  $LTB_4$ -BLT1 シグナルの寄与



さらに、術後痛モデルについて得られた知見は、BLT1受容体欠損マウスにおいて疼痛反応の減弱の確認のみにとどまった。同モデルは、足底切開による炎症反応が数日持続し局所からの侵害受容入力が続いて起きることで、脊髄後角ニューロンの興奮性が増大した状態が続くことが示されている。図23に示すように、LTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルは、局所における白血球浸潤を増加させて炎症反応を増悪し疼痛反応を増大させるものと推測される。BLT1受容体欠損マウスの術後痛モデルでは、ホルマリンテストの場合と同様に、局所の炎症所見の軽減が予測される。今後浮腫や局所好中球浸潤・MPO活性などを指標としてLTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルが術後痛モデルの局所炎症反応に与える程度を評価する必要がある。

また、他のモデルと同様にLTB<sub>4</sub>の局所や脊髄における定量化実験は技術的に困難と考えられる。BLT1拮抗薬を用いた実験を行い、LTB<sub>4</sub>-BLT1シグナルの術後痛モデルにおける重要な作用部位およびメカニズムについて検討を重ねていきたいと考えている。

なお、本論文の内容の一部は、Asahara M et al. :Mol Pain(2015) [67]に発表した内容を翻訳し再構成したものである。

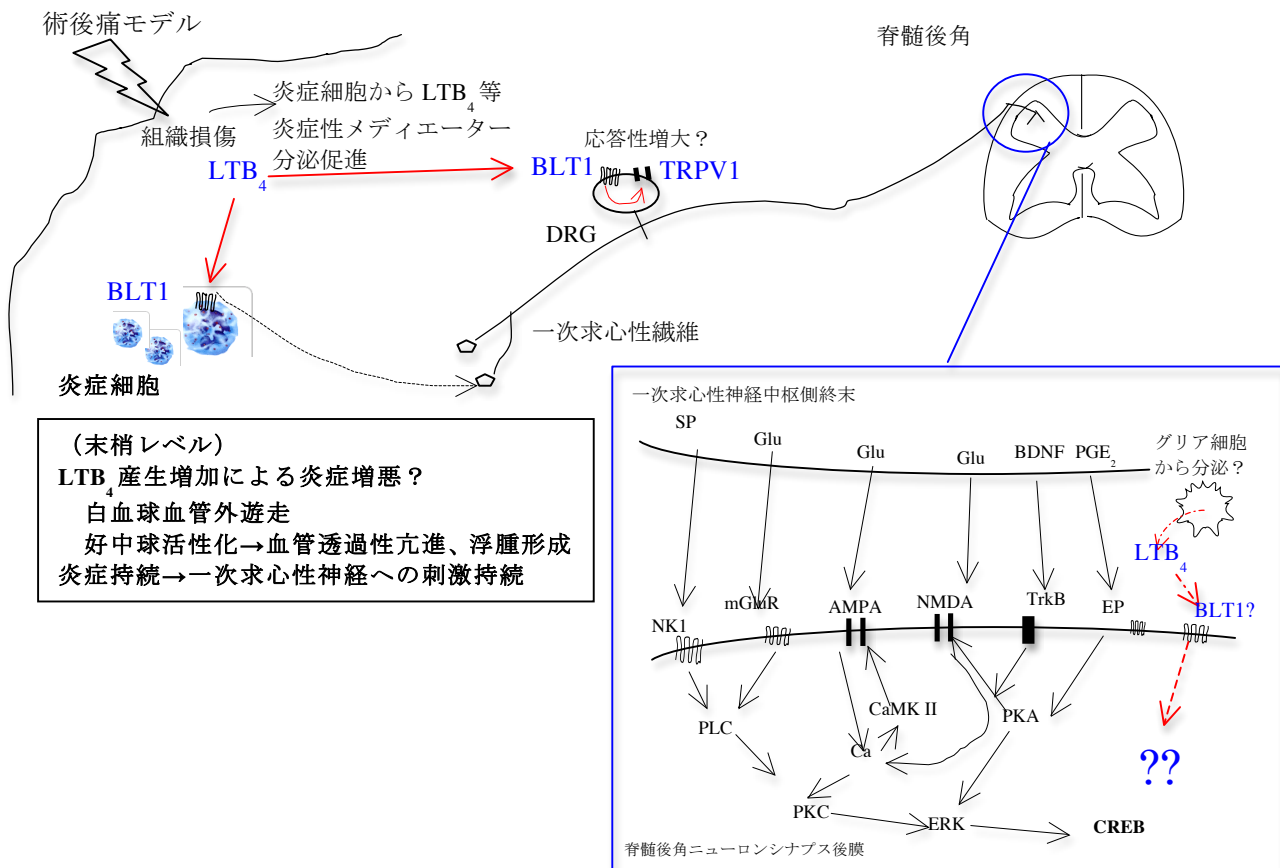


図 23 術後痛モデルの疼痛反応における  $LTB_4$ -BLT1 シグナルの寄与

## 7.「謝辞」

本研究の遂行にあたり、総括的な御指導と御鞭撻を賜りました東京大学大学院医学系研究科 清水孝雄特任教授（国立国際医療センター研究所長）、順天堂大学大学院医学系研究科生化学第一講座 横溝岳彦教授、岡山大学臨床生命科学科細胞情報学 中村元直教授に深甚なる感謝の意を表します。また研究計画、実験の遂行、論文作成に至るまで全面的な御協力及び御指導を頂きました東京大学医学部大学院医学系研究科外科学専攻生体管理医学講座麻酔学教室伊藤伸子講師に深謝いたします。また本研究にあたり多くの御助言を頂きました国立国際医療研究センター脂質シグナリングプロジェクトの皆様、東京大学大学院医学系研究科リポドミクス社会連携講座の皆様、東京大学医学部附属病院麻酔科学教室の皆様に深く御礼申し上げます。

最後に、本研究の遂行の機会を与えてくださり御指導を賜りました東京大学医学部大学院医学系研究科外科学専攻生体管理医学講座麻酔学教室 山田芳嗣教授に深く御礼申し上げます。

## 8. 「引用文献」

1. Shimizu T (2009) Lipid mediators in health and disease: enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation. . *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 49: 123-150.
2. Yokomizo T IT, Chang K, Takuwa Y, Shimizu T (1997) A G-protein-coupled receptor for leukotriene B4 that mediates chemotaxis. . *Nature* 387: 620-624.
3. Yokomizo T KK, Terawaki K, Izumi T, Shimizu T (2000) A second leukotriene B4 receptor, BLT2: A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. . *J Exp Med* 192: 421-431.
4. Yokomizo T IT, Shimizu T (2001) Leukotriene B4: metabolism and signal transduction. . *Arch Biochem Biophys* 385: 231-241.
5. Hikiji H, Ishii S, Yokomizo T, Takato T, Shimizu T (2009) A distinctive role of the leukotriene B4 receptor BLT1 in osteoclastic activity during bone loss. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 21294-21299.
6. Kim N LA (2007) Regulation of immune cells by eicosanoid receptors. . *ScientificWorldJournal* 7: 1307-1328.
7. Haribabu B VM, Steeber DA, Sellars DD, Bock CB, Snyderman R (2000) Targeted disruption of the leukotriene B(4)receptor in mice reveals its role in inflammation and platelet-activating factor-induced anaphylaxis. . *J Exp Med* 192: 433-438.
8. Tager AM DJ, Goodarzi K, Bercury SD, von Andrian UH, Luster AD (2000) BLTR mediates leukotriene B(4)-induced chemotaxis and adhesion and plays a dominant role in eosinophil accumulation in a murine model of peritonitis. . *J Exp Med* 192: 439-446.
9. Terawaki K, Yokomizo T., Nagase, T., Toda, A., Taniguchi, M., Hashizume, K., Yagi, T., Shimizu, T. (2005) Absence of leukotriene B4 receptor 1 confers resistance to airway hyperresponsiveness and Th2-type immune responses. *J Immunol* 175: 4217-4225.
10. Tager AM BS, Medoff BD, Islam SA, Bercury SD, Friedrich EB, Carafone AD, Gerszten RE, Luster AD (2003) Leukotriene B4 receptor BLT1 mediates early effector T cell recruitment. . *Nat Immunol* 4: 982-990.
11. Kihara Y, Yokomizo, T., Kunita, A., Morishita, Y., Fukayama, M., Ishii, S., Shimizu, T. (2010) The leukotriene B4 receptor, BLT1, is required for the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biochem Biophys Res Commun* 394: 673-678.
12. Kim ND, Chou RC, Seung E, Tager AM, Luster AD (2006) A unique requirement for the leukotriene B4 receptor BLT1 for neutrophil recruitment in inflammatory arthritis. *J Exp Med* 203: 829-835.
13. Sumida H, Yanagida, K., Kita, Y., Abe, J., Matsushima, K., Nakamura, M., Ishii, S., Sato, S., Shimizu, T. (2014) Interplay between CXCR2 and BLT1 facilitates neutrophil infiltration and resultant keratinocyte activation in a murine model of imiquimod-induced psoriasis. *J Immunol* 192: 4361-4369.
14. Madison S, Whitsel EA, Suarez-Roca H, Maixner W (1992) Sensitizing effects of leukotriene B4 on intradental primary afferents. *Pain* 49: 99-104.
15. Trang T, McNaull B, Quirion R, Jhamandas K (2004) Involvement of spinal lipoxygenase metabolites in hyperalgesia and opioid tolerance. *Eur J Pharmacol*

- 491: 21-30.
16. Okubo M, Yamanaka H, Kobayashi K, Fukuoka T, Dai Y, Noguchi K. (2010) Expression of leukotriene receptors in the rat dorsal root ganglion and the effects on pain behaviors. *Mol Pain* 6: 57.
  17. Okubo M, Yamanaka H, Kobayashi K, Noguchi K (2010) Leukotriene synthases and the receptors induced by peripheral nerve injury in the spinal cord contribute to the generation of neuropathic pain. *Glia* 58: 599-610.
  18. Chiba Y, Shimada A, Satoh M, Saitoh Y, Kawamura N, et al. (2006) Sensory system-predominant distribution of leukotriene A4 hydrolase and its colocalization with calretinin in the mouse nervous system. *Neuroscience* 141: 917-927.
  19. Ji RR, Kohno T, Moore KA, Woolf CJ (2003) Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci* 26: 696-705.
  20. Julius D, Basbaum AI (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413: 203-210.
  21. Kawasaki Y, Kohno T, Zhuang Z. Y., Brenner G. J., Wang H., Van Der Meer C., Befort K., Woolf C. J., Ji R. R. (2004) Ionotropic and metabotropic receptors, protein kinase A, protein kinase C, and Src contribute to C-fiber-induced ERK activation and cAMP response element-binding protein phosphorylation in dorsal horn neurons, leading to central sensitization. *J Neurosci* 24: 8310-8321.
  22. Impey S, Fong A. L., Wang Y., Cardinaux J. R., Fass D. M., Obrietan K., Wayman G. A., Storm D. R., Soderling T. R., Goodman R. H. (2002) Phosphorylation of CBP mediates transcriptional activation by neural activity and CaM kinase IV. *Neuron* 34: 235-244.
  23. Sheng M, Thompson MA, Greenberg ME (1991) CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science* 252: 1427-1430.
  24. Anderson LE, Seybold VS (2000) Phosphorylated cAMP response element binding protein increases in neurokinin-1 receptor-immunoreactive neurons in rat spinal cord in response to formalin-induced nociception. *Neurosci Lett* 283: 29-32.
  25. Ji RR, Rupp F (1997) Phosphorylation of transcription factor CREB in rat spinal cord after formalin-induced hyperalgesia: relationship to c-fos induction. *J Neurosci* 17: 1776-1785.
  26. Fang L, Wu J, Zhang X, Lin Q, Willis WD (2003) Increased phosphorylation of the GluR1 subunit of spinal cord alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate receptor in rats following intradermal injection of capsaicin. *Neuroscience* 122: 237-245.
  27. Wu J, Su G., Ma L., Zhang X., Lei Y., Li J., Lin Q., Fang L. (2005) Protein kinases mediate increment of the phosphorylation of cyclic AMP-responsive element binding protein in spinal cord of rats following capsaicin injection. *Mol Pain* 1: 26.
  28. Caterina MJ, Schumacher M. A., Tominaga M., Rosen T. A., Levine J. D., Julius D. (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389: 816-824.
  29. Kobayashi K, Fukuoka T., Obata K., Yamanaka H., Dai Y., Tokunaga A., Noguchi K. (2005) Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with delta/c-fibers and colocalization with trk receptors. *J Comp Neurol* 493: 596-606.

30. McCarthy PW, Lawson SN (1990) Cell type and conduction velocity of rat primary sensory neurons with calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity. *Neuroscience* 34: 623-632.
31. Dubuisson D, Dennis SG (1977) The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 4: 161-174.
32. Sakurada T, Katsumata K, Tan-No K, Sakurada S, Kisara K (1992) The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. *Neuropharmacology* 31: 1279-1285.
33. Pogatzki EM, Raja SN (2003) A mouse model of incisional pain. *Anesthesiology* 99: 1023-1027.
34. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 53: 55-63.
35. Hu WP, Zhang, C., Li, J. D., Luo, Z. D., Amadesi, S., Bunnett, N., Zhou, Q. Y. (2006) Impaired pain sensation in mice lacking prokineticin 2. *Mol Pain* 2: 35.
36. Iizuka Y, Okuno, T., Saeki, K., Uozaki, H., Okada, S., Misaka, T., Sato, T., Toh, H., Fukayama, M., Takeda, N., Kita, Y., Shimizu, T., Nakamura, M., Yokomizo, T. (2010) Protective role of the leukotriene B4 receptor BLT2 in murine inflammatory colitis. *FASEB J* 24: 4678-4690.
37. Chiu IM, Heesters, B. A., Ghasemlou, N., Von Hehn, C. A., Zhao, F., Tran, J., Wainger, B., Strominger, A., Muralidharan, S., Horswill, A. R., Bubeck Wardenburg, J., Hwang, S. W., Carroll, M. C., Woolf, C. J. (2013) Bacteria activate sensory neurons that modulate pain and inflammation. *Nature* 501: 52-57.
38. Andoh T, Kuraishi Y (1998) Intradermal leukotriene B4, but not prostaglandin E2, induces itch-associated responses in mice. *Eur J Pharmacol* 353: 93-96.
39. Saiwai H, Ohkawa, Y., Yamada, H., Kumamaru, H., Harada, A., Okano, H., Yokomizo, T., Iwamoto, Y., Okada, S. (2010) The LTB4-BLT1 axis mediates neutrophil infiltration and secondary injury in experimental spinal cord injury. *Am J Pathol* 176: 2352-2366.
40. Hylden JL, Wilcox GL (1980) Intrathecal morphine in mice: a new technique. *Eur J Pharmacol* 67: 313-316.
41. Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K (1992) The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51: 5-17.
42. McNamara CR, Mandel-Brehm, J., Bautista, D. M., Siemens, J., Deranian, K. L., Zhao, M., Hayward, N. J., Chong, J. A., Julius, D., Moran, M. M., Fanger, C. M. (2007) TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 13525-13530.
43. Ji RR, Samad TA, Jin SX, Schmoll R, Woolf CJ (2002) p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron* 36: 57-68.
44. Julius D (2013) TRP channels and pain. *Annu Rev Cell Dev Biol* 29: 355-384.
45. Bautista DM, Jordt, S. E., Nikai, T., Tsuruda, P. R., Read, A. J., Poblete, J., Yamoah, E. N., Basbaum, A. I., Julius, D. (2006) TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 124: 1269-1282.
46. Dai Y, Wang, S., Tominaga, M., Yamamoto, S., Fukuoka, T., Higashi, T., Kobayashi, K., Obata, K., Yamanaka, H., Noguchi, K. (2007) Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. *J Clin Invest* 117: 1979-1987.

47. Kosugi M, Nakatsuka T, Fujita T, Kuroda Y, Kumamoto E (2007) Activation of TRPA1 channel facilitates excitatory synaptic transmission in substantia gelatinosa neurons of the adult rat spinal cord. *J Neurosci* 27: 4443-4451.
48. Shields SD, Cavanaugh DJ, Lee H, Anderson DJ, Basbaum AI (2010) Pain behavior in the formalin test persists after ablation of the great majority of C-fiber nociceptors. *Pain* 151: 422-429.
49. Tsuji F, Oki, K., Fujisawa, K., Okahara, A., Horiuchi, M., Mita, S. (1999) Involvement of leukotriene B4 in arthritis models. *Life Sci* 64: PL51-56.
50. Di Gennaro A, Kenne, E., Wan, M., Soehnlein, O., Lindbom, L., Haeggstrom, J. Z. (2009) Leukotriene B4-induced changes in vascular permeability are mediated by neutrophil release of heparin-binding protein (HBP/CAP37/azurocidin). *FASEB J* 23: 1750-1757.
51. Rosland JH, Tjolsen A, Maehle B, Hole K (1990) The formalin test in mice: effect of formalin concentration. *Pain* 42: 235-242.
52. Gregus AM, Dumlao, D. S., Wei, S. C., Norris, P. C., Catella, L. C., Meyerstein, F. G., Buczynski, M. W., Steinauer, J. J., Fitzsimmons, B. L., Yaksh, T. L., Dennis, E. A. (2013) Systematic analysis of rat 12/15-lipoxygenase enzymes reveals critical role for spinal eLOX3 hepoxilin synthase activity in inflammatory hyperalgesia. *FASEB J* 27: 1939-1949.
53. Hwang SW, Cho, H., Kwak, J., Lee, S. Y., Kang, C. J., Jung, J., Cho, S., Min, K. H., Suh, Y. G., Kim, D., Oh, U. (2000) Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6155-6160.
54. Patwardhan AM, Scotland PE, Akopian AN, Hargreaves KM (2009) Activation of TRPV1 in the spinal cord by oxidized linoleic acid metabolites contributes to inflammatory hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 18820-18824.
55. Sugiura T, Tominaga M, Katsuya H, Mizumura K (2002) Bradykinin lowers the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1. *J Neurophysiol* 88: 544-548.
56. Lin CR, Amaya, F., Barrett, L., Wang, H., Takada, J., Samad, T. A., Woolf, C. J. (2006) Prostaglandin E2 receptor EP4 contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *J Pharmacol Exp Ther* 319: 1096-1103.
57. Moriyama T, Higashi, T., Togashi, K., Iida, T., Segi, E., Sugimoto, Y., Tominaga, T., Narumiya, S., Tominaga, M. (2005) Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. *Mol Pain* 1: 3.
58. Dai Y, Moriyama, T., Higashi, T., Togashi, K., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Tominaga, M., Noguchi, K. (2004) Proteinase-activated receptor 2-mediated potentiation of transient receptor potential vanilloid subfamily 1 activity reveals a mechanism for proteinase-induced inflammatory pain. *J Neurosci* 24: 4293-4299.
59. Tominaga M, Wada M, Masu M (2001) Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6951-6956.
60. Gu Q, Kwong K, Lee LY (2003) Ca<sup>2+</sup> transient evoked by chemical stimulation is enhanced by PGE2 in vagal sensory neurons: role of cAMP/PKA signaling pathway. *J Neurophysiol* 89: 1985-1993.
61. Smith JA, Davis CL, Burgess GM (2000) Prostaglandin E2-induced sensitization of bradykinin-evoked responses in rat dorsal root ganglion neurons is mediated by

- cAMP-dependent protein kinase A. *Eur J Neurosci* 12: 3250-3258.
62. Andoh T, Kuraishi Y (2005) Expression of BLT1 leukotriene B4 receptor on the dorsal root ganglion neurons in mice. *Brain Res Mol Brain Res* 137: 263-266.
  63. Baba H, Kohno T, Moore KA, Woolf CJ (2001) Direct activation of rat spinal dorsal horn neurons by prostaglandin E2. *J Neurosci* 21: 1750-1756.
  64. Tsuda M, Ishii, S., Masuda, T., Hasegawa, S., Nakamura, K., Nagata, K., Yamashita, T., Furue, H., Tozaki-Saitoh, H., Yoshimura, M., Koizumi, S., Shimizu, T., Inoue, K. (2007) Reduced pain behaviors and extracellular signal-related protein kinase activation in primary sensory neurons by peripheral tissue injury in mice lacking platelet-activating factor receptor. *J Neurochem* 102: 1658-1668.
  65. Watkins LR, Martin D, Ulrich P, Tracey KJ, Maier SF (1997) Evidence for the involvement of spinal cord glia in subcutaneous formalin induced hyperalgesia in the rat. *Pain* 71: 225-235.
  66. Watkins LR, Milligan ED, Maier SF (2001) Spinal cord glia: new players in pain. *Pain* 93: 201-205.
  67. Asahara M, Ito, N. , Yokomizo, T., Nakamura, M., Shimizu, T., Yamada, Y. (2015) The absence of the leukotriene B4 receptor BLT1 attenuates peripheral inflammation and spinal nociceptive processing following intraplantar formalin injury. *Mol Pain*: 11:11.