

論文の内容の要旨

論文題目 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

ロイコトリエン B₄ (LTB₄) はアラキドン酸由来の生理活性脂質であり、受容体として高親和性受容体 BLT1 及び低親和性受容体 BLT2 が同定されている。BLT1 は主に好中球などの白血球に発現し、LTB₄ は BLT1 を介して強力な白血球走化作用を発揮する。BLT1 受容体欠損マウスを用いた種々の研究により、LTB₄-BLT1 シグナルと気管支喘息、関節リウマチ、多発性硬化症等の様々な炎症性疾患の病態形成との強い関連性が示されている。疼痛との関連については、LTB₄ の皮下注射により痛覚過敏が生じること、LTB₄ のくも膜下投与がホルマリン足底注射による疼痛反応を増強させること、BLT1 受容体については後根神経節や脊髄において発現が確認されており神経障害性疼痛モデルではその発現が増強すること等の報告がある。LTB₄-BLT1 シグナルが疼痛の病態形成に大きく寄与する可能性が示唆されるものの、十分に解明されていない。

組織損傷に伴う炎症時には、局所で様々な炎症性メディエーターが分泌され、侵害受容体の閾値低下（末梢性感作）がおこる。すると一次求心性線維終末から分泌されたグルタミン酸やサブスタンスPなどが脊髄後角シナプス後膜上のNMDA (N-methyl-D-aspartate) 受容体等に作用して、脊髄後角において転写因子cyclic AMP response element-binding protein (CREB)が活性化される。その結果中枢性感作の状態に至り疼痛の増悪・遷延化が進行する。

ホルマリンテスト、カプサイシンテストは、各々ホルマリンまたはカプサイシンを動物の後肢足蹠皮下に注射して自発痛を生じさせる急性痛モデルである。ホルマリンテストでは2相性の疼痛反応が認められ、1st phase は局所刺激に対する初期反応を、2nd phase はその後の脊髄後角における CREB 活性化を介した中枢性感作をそれぞれ反映するとされている。カプサイシンテストの疼痛においても脊髄後角における CREB の活性化が関連することが知られている。

本研究ではまず LTB₄-BLT1 シグナルが急性痛の病態形成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ホルマリン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疼痛行動実験を行った。ホルマリンテスト及びカプサイシンテストでは投与側後肢に対する licking (舐める)、biting (噛む)、flinching (振り回す)行動時間を疼痛反応の指標とした。術後痛モデルは足底に皮膚切開による損傷を与えるモデルで、切開約2時間後より機械的刺激に対する疼痛閾値の低下が認められる。切開前、切開2時間後及び1-7日後に von frey test を行い痛覚過敏の程度を評価した。

BLT1 受容体欠損マウスにおけるホルマリンテスト 2nd phase の反応は野生型マウスに比べて有意に減少していた。また BLT1 受容体欠損マウスではカプサイシンテストの疼痛反応の有意な減弱を認めた。術後痛モデルにおける患側肢の機械的痛覚過敏は、切開4日後までの間 BLT1-野生

型マウスに比べて有意に抑制されていた。BLT1 受容体欠損マウスではホルマリンテスト、カプサイシンテストにおける急性疼痛反応及び術後痛モデルにおける疼痛反応が減弱していることが分かった。

続いて、BLT1 受容体欠損マウスの脊髄及び後根神経節における侵害受容器の発現を野生型マウスと比較した。有髄 A δ 線維や無髄 C 線維の自由神経終末上に存在する痛みの侵害受容器として transient receptor potential (TRP)チャンネルファミリーに属する TRPA1 と TRPV1 が知られている。そこで後根神経節における TRPA1、TRPV1 及び A δ 線維や C 線維に存在する CGRP の発現の程度を免疫染色またはリアルタイム PCR により比較検討した。BLT1 受容体欠損マウスの後根神経節における TRPV1、TRPA1、CGRP の発現の程度は野生型マウスと同程度であった。脊髄における TRPA1・TRPV1 の発現についても同程度であり、BLT1 受容体欠損マウスの侵害受容器の発現は野生型マウスと同等であることが分かった。

ホルマリンテストにおける足底の炎症反応の程度について検討した。BLT1 受容体欠損マウスにおいては、野生型マウスに比べて、ホルマリン投与後の足容積増加率及び足底における好中球ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性が有意に低値であった。また、野生型マウスでは、ホルマリン投与後の局所の有意な血管透過性亢進を認めた。BLT1 受容体欠損マウスにおいても局所の血管透過性の増加がみられたが有意な増加ではなかった。足蹠組織のフローサイトメトリーによる解析では野生型マウスにおいて有意な好中球の増加を認めた。BLT1 受容体欠損マウスにおいても好中球の増加を認めたが、有意な増加ではなかった。以上から BLT1 受容体欠損マウスでは、野生型マウスに比べて、ホルマリン足底投与後の局所炎症反応が減弱していることが分かった。

次に、LTB₄-BLT1 シグナルがホルマリン投与による中枢性感作に与える影響を検討するため、ホルマリン投与 20 分後の脊髄後角における CREB の活性化について免疫染色により検討した。カプサイシン投与後のマウスについても同様の検討を行った。ホルマリン投与後の脊髄後角 CREB 活性は BLT1 受容体欠損マウスで有意に減弱していた。カプサイシン投与後のマウスにおいても同様の所見が得られた。BLT1 受容体欠損マウスではホルマリンまたはカプサイシン投与後の CREB 活性化で示される中枢性感作が抑制されていることが分かった。

さらに、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与える影響について、腹腔内投与、足底皮下注射及びくも膜下投与の 3 つの投与経路を用いて検討した。また脊髄後角における CREB の活性化の程度を検討した。

BLT1 受容体拮抗薬 ONO-4057 の前投与は、いずれの投与経路の場合でも疼痛反応を有意に減弱させた。また、ONO-4057 を腹腔内投与または足底注射したマウスでは、vehicle を投与されたマウスに比べてホルマリン投与後の脊髄後角における CREB の活性化が有意に抑制されることがわかった。

以上から、LTB₄-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病態に寄与する可能性が示唆された。また BLT1 受容体欠損マウスの脊髄や後根神経節における TRPA1、TRPV1 及び CGRP の発現の程度は

野生型マウスと同等であり、BLT1 受容体欠損マウスにおける疼痛反応の減弱は侵害受容ニューロンの特徴の違いによるものではないと考えられた。

BLT1受容体欠損マウスの急性痛モデルにおける疼痛反応の減弱のメカニズムとして、第一に、局所炎症反応が有意に抑制されたことがあげられる。BLT1受容体拮抗薬の末梢局所注射によってもホルマリンテスト2nd phaseの疼痛反応の有意な減弱が認められ、LTB₄-BLT1シグナルは末梢レベルでホルマリン投与後の疼痛反応に寄与する可能性が示唆された。侵害刺激が加わった末梢局所において、LTB₄-BLT1シグナルは、白血球走化、多形核好中球の活性化や血管透過性の亢進をきたすことで、ホルマリン投与による疼痛の維持・増悪に関与している可能性が示唆された。

第二に、LTB₄-BLT1シグナルの阻害により、ホルマリン投与後の中枢性感作が抑制されたことがあげられる。中枢性感作の誘導には脊髄後角における CREB の活性化が必要であり、これには ERK (Extracellular Signal-regulated Kinase)などのキナーゼの活性化が重要である。LTB₄-BLT1シグナルによる CREB の活性化の機序として、いくつかの可能性が考えられる。第一に末梢の炎症により一次知覚神経が刺激される結果起こる脊髄ニューロンでの ERK の活性化を介したもので、第二には BLT1 を介した LTB₄シグナルが脊髄ニューロンにおいて ERK を直接活性化する結果 CREB が活性化されるという機序である。BLT1 受容体拮抗薬のくも膜下投与がホルマリンテスト 2nd phase の疼痛反応を有意に減弱していたことから、LTB₄-BLT1シグナルは末梢局所だけでなく脊髄レベルにおいても急性痛の発生メカニズムに寄与する可能性が示唆された。プロスタグランジン E2 のような他の脂質メディエーターと同様に、LTB₄-BLT1シグナルが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可能性も考えられる。LTB₄シグナルが BLT1 受容体を介して脊髄後角のシナプス電流にどのように影響するのかについては新たな電気生理学的な検討が必要である。

本研究では、術後痛モデルにおける LTB₄-BLT1シグナルの役割について詳細な検討ができなかった。同モデルでは足底切開により数日間炎症反応が持続することで中枢への侵害受容入力が続く結果、脊髄後角ニューロンの興奮性が増大した状態が維持される事が示されている。ホルマリンやカプサイシンの足底投与による急性痛モデルに比べてより複雑な機序で疼痛が維持される。今後同モデルを用いて急性組織障害性疼痛の病態形成における LTB₄-BLT1シグナルの寄与について検討し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. *Molecular Pain* 2015, 11:11 に発表した内容を翻訳し、再構成したものである。