

令和元年5月24日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08668

研究課題名(和文)慢性虚血性疼痛における各種成長因子の関与とその末梢感作機構の解明

研究課題名(英文) Nerve Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor contribute to chronic ischemic pain in a rat model of peripheral arterial disease.

研究代表者

堀 紀代美 (Hori, Kiyomi)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：40595443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：末梢動脈疾患(peripheral arterial disease:PAD)に伴う虚血性疼痛のメカニズムを解析するために、我々が開発したPADのモデル動物を用いて、下肢の虚血に起因する痛覚過敏に成長因子の神経成長因子(NGF)や血管内皮成長因子(VEGF)が関与するか検索した。SDラットの左下肢への血流を阻害すると慢性の筋痛、間欠性跛行が認められた。虚血下肢筋でNGF量が増加し、NGFやVEGFの阻害は筋痛を抑制した。末梢動脈疾患における痛覚の亢進にはNGFやVEGFが重要と思われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

末梢動脈疾患(PAD)では、手足の冷感や、歩行時や運動時にふくらはぎ、臀部、大腿部の筋に発生する痛み(間欠性跛行)が症状として最も多く、大きな問題となっている。ADは急速な社会の高齢化に加え、食生活の欧米化、などに伴い増加しており、高齢者に高い疾患頻度が報告されているが、四肢末梢における虚血性疼痛の機序はほとんど研究が進んでおらず、経過観察および対症療法でしか対応できていない。本研究により、虚血性の筋痛と成長因子NGFやVEGFとの関与が明らかになり、さらなるメカニズムの解明は必要ではあるが、除痛法の開発につながることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：AIM: To demonstrate neuronal mechanisms underlying ischemic pain with peripheral arterial disease (PAD), we investigated the role of NGF and VEGF on muscle hyperalgesia and intermittent claudication in a rat model of PAD. METHODS: We ligated the left common iliac and iliolumbar arteries completely. NGF and VEGF proteins in the gastrocnemius muscle (GM) were measured respectively. Effects of inhibitor of TrkA, a receptor of NGF, and VEGFR2, a receptor of VEGF were evaluated on behavioral responses. The expression of TrkA- and VEGFR2-receptor were examined in DRG neurons innervating GM. RESULT: We found muscle hyperalgesia and intermittent claudication after ligation. NGF protein level increased in GM and intramuscular injection of either TrkA- and VEGFR2-inhibitor suppressed muscle hyperalgesia in PAD rats. CONCLUSION: NGF and VEGF may play an important role in developing muscle hyperalgesia associated with PAD.

研究分野：神経科学

キーワード：末梢動脈疾患 PAD 虚血性疼痛 筋痛 間欠性跛行 神経成長因子 血管内皮成長因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

組織の虚血は疼痛をもたらす、四肢の末梢領域において閉塞性動脈硬化症などの末梢動脈疾患(PAD)では、手足の冷感や、歩行時や運動時にふくらはぎ、臀部、大腿部の筋に発生する痛み(間歇性跛行)が症状として最も多く、QOL (Quality of Life) や ADL (activities of daily life) の低下をもたらす大きな問題となっている (Pande et al., 2011)。PAD は急速な社会の高齢化に加え、食生活の欧米化、車社会を中心とした生活様式の変化に伴い増加しており、高齢者において 10-15% と高い疾患頻度が報告されているが、心臓領域に比べ、四肢末梢における虚血性疼痛の機序は基礎的にも臨床的にもほとんど研究が進んでいない。

神経成長因子 (nerve growth factor : NGF) は神経の生存や分化を調節するが、炎症性や神経因性疼痛、そして筋痛において誘導され、疼痛の発現において重要な役割をもつと報告されている。我々も NGF が筋痛 (Hayashi et al., 2011) や骨折の痛み (Yasui et al., 2012) に関与していることを明らかにしている。NGF はマウスの虚血下肢筋で増加し、虚血筋の血管新生にも関与することが報告される (Emanueli et al., 2002) が、虚血性疼痛における NGF の関与は明らかではない。

組織低酸素により誘導される血管内皮成長因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) は、PAD 患者の下肢筋で濃度増加が報告され、そして近年、P2X_{2/3} の発現増加および機能の亢進を介して神経因性疼痛に関与することが報告された (Liu et al., 2012)。また VEGF は神経保護作用も有すると報告され、NGF との機能面での Cross-talk が示唆されている。

我々は PAD の虚血性疼痛のメカニズムを明らかにするためモデル動物の開発に取り組み、総腸骨動脈および腸腰動脈を結紮することにより下肢の血流を阻害したラットでは慢性的な筋の痛覚過敏が認められ、また間歇性跛行が数ヶ月持続することを確認し、さらに冷刺激に対しても痛覚過敏が見られる、臨床に近い慢性的な虚血性筋痛を伴う PAD のモデルラットの開発に成功した。さらに、このモデル動物を用いて、痛みの受容器への刺激を電気信号に変換するイオンチャネルについて検索したところ、虚血性の筋痛には、TRPV1 の関与は低いものの、P2X_{3,2/3} や ASIC3 が関与し、また冷痛覚過敏には TRPA1 が関与し、これらのイオンチャネルの活性化による一次知覚神経の興奮性の亢進が虚血性疼痛を引き起こすことを示す知見を得た。これらの知見より、虚血下肢において、成長因子 NGF・VEGF が誘導され、P2X_{2/3} 等を介して筋の侵害受容器を感作し、虚血性疼痛を引き起こすと考えた。

2. 研究の目的

本研究では我々が開発した動物モデルを用いて、下肢の虚血に起因する痛覚過敏に関与する成長因子を検索し、その末梢感作のメカニズムを明らかにすることにより、PAD で見られる虚血性疼痛の効果的な治療法の開発につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 虚血性疼痛における成長因子の関与に対する行動薬理学評価

PAD のモデル動物として、全身麻酔下でラットの総腸骨動脈および腸腰動脈を結紮し下肢の血流を阻害した下肢虚血モデルラットを作成する。対照群では動脈の露出のみ行う。この PAD モデルラットでは、動脈結紮後より皮膚の痛覚過敏が 7 日間、筋の痛覚過敏が 21 日間認められ、間歇性跛行が数ヶ月持続し、さらに冷痛覚過敏が 7 日目から 14 日目まで認められることを確認している (図 1)。このモデル動物を用いて、成長因子 NGF と VEGF の虚血性疼痛への関与を調べるため、虚血によって痛覚が亢進したモデル動物に NGF 受容体の拮抗薬 (K252a) および VEGF の受容体の拮抗薬 (PTK787) を投与して、疼痛行動の変化を行動薬理的に調べる。

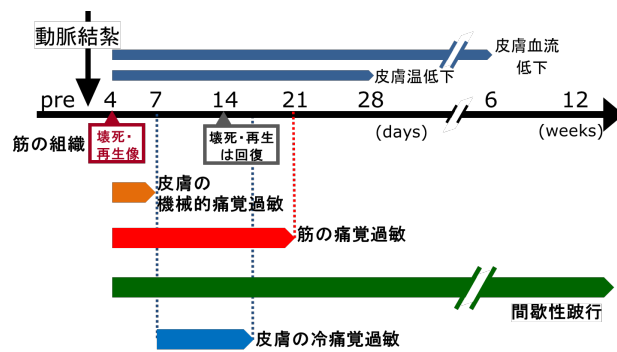


図1 下肢虚血(PADモデル)ラットの痛覚閾値の変化のまとめ

(2) PAD モデル動物における、成長因子 NGF および VEGF の虚血下肢での発現量

PAD モデルの虚血下肢の皮膚および筋組織内の NGF および VEGF の産生を確認するため、PAD ラットの足底の皮膚と腓腹筋の NGF と VEGF タンパクの発現量をそれぞれ ELISA 法により測定する。

(3) PAD モデル動物の知覚神経における NGF および VEGF の受容体の発現

動脈結紮による下肢の虚血によって痛覚が亢進したモデル動物の下腿の知覚神経終末や後根神経節 (DRG) における NGF の受容体 TrkA および VEGF の受容体 VEGFR2 の発現の変化を免疫組織化学的に調べる。筋の痛覚における成長因子受容体発現の関与を調べるためには、腓腹筋に逆行性トレーサー-Fluoro-gold (FG) を投与し筋の知覚神経を標識し、FG と TrkA および VEGFR2 の共陽性細胞を検索することで、筋の知覚神経について検討する。陽性細胞および共陽性細胞は細胞径ごとに分類し比較検討する。

(4) 虚血性疼痛における末梢感作機構の解析：イオンチャネルの発現に対する成長因子の関与
我々はこれまでに PAD モデル動物の虚血性の筋痛にはイオンチャネル P2X_{3,2/3} や ASIC3 が関与し、また冷痛覚過敏には TRPA1 が関与し、これらのイオンチャネルの活性化による一次知覚神経の興奮性の亢進が虚血性疼痛を引き起こすことを明らかにした (Hori et al., 2012)。これより、PAD モデル動物の虚血性疼痛において、成長因子がイオンチャネルの発現増加を引き起こすかを調べるため、あらかじめ成長因子の中和抗体を投与した PAD モデル動物のイオンチャネルの発現の変化を調べる。

4. 研究成果

(1) 成長因子 NGF および VEGF の関与に対する行動薬理学評価

疼痛行動評価で皮膚の機械的痛覚過敏は回復し筋の機械的痛覚過敏のみ認められる 2 週目 (14 日) の行動薬理学評価より、筋の痛覚過敏と間欠性跛行に対し、NGF 受容体 TrkA、ならびに VEGF 受容体の VEGFR2 の拮抗薬は筋の痛覚過敏を抑制した (図 2)。しかしながら、間欠性跛行には変化を認めなかった (図 2)。

(2) 成長因子 NGF および VEGF の虚血下肢での発現量

筋の機械的痛覚過敏のみ認められる 14 日目の腓腹筋の ELISA およびウエスタンブロットより、虚血肢の腓腹筋の NGF 量は増加したが VEGF 量は変化を認めなかった。

(3) PAD モデル動物の知覚神経における NGF および VEGF の受容体の発現

筋の機械的痛覚過敏のみ認められる 14 日目の DRG の免疫組織学的

評価より TrkA の発現総数に変化は認めなかった。また FG 陽性の腓腹筋の知覚ニューロンにおける TrkA の発現も変化を認めなかった。しかしながら、VEGFR2 については DRG 全体でも腓腹筋の知覚ニューロンでも発現が増加した。

(4) ASIC3 の発現に対する NGF の関与

動脈結紮直後から 13 日目まで 1 日 1 回 (全 14 回) NGF の中和抗体を連続投与して継続的に NGF を阻害すると、PAD モデル動物の ASIC3 の発現増加が抑制された (図 3)。

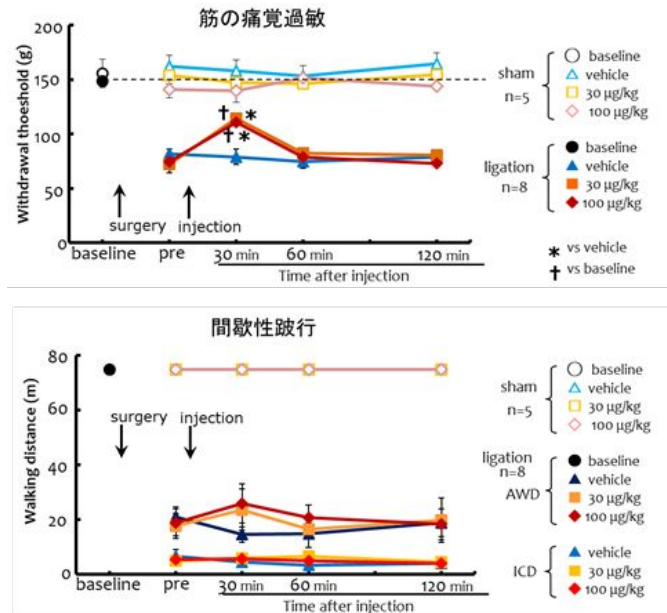


図2 TrkA拮抗薬に対する行動薬理学評価

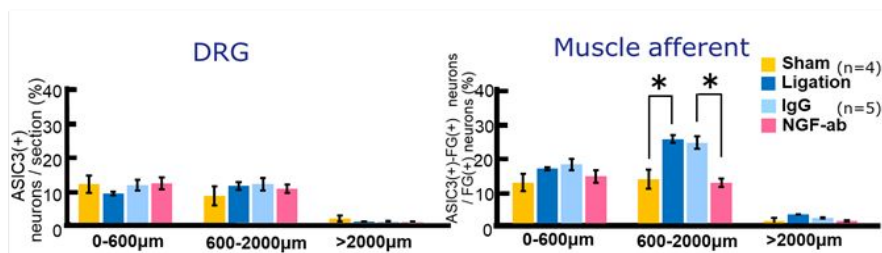


図3 NGF中和抗体投与後の筋の知覚神経のASIC3発現変化

以上の実験結果から、下肢虚血モデルラットは慢性的な筋の痛覚過敏と間欠性跛行、冷痛覚過敏を呈し、PADの虚血性疼痛のメカニズムの解明に有用であることがわかった。また、下肢の血流障害による筋の痛覚過敏には、NGFを介したASIC3、およびP2X_{3,2/3}、またはVEGFの関与が示唆され、PADにおける虚血性疼痛の発現に重要と思われた。

< 引用文献 >

- Pande et al. Secondary prevention and mortality in peripheral artery disease: National Health and Nutrition Examination Study, 1999 to 2004. *Circulation*. 124: 17-23, 2011
- Hayashi, Hori et al. Involvement of NGF in the Rat Model of Persistent Muscle Pain Associated With Taut Band. *J Pain*. 12(10):1059-68, 2011
- Yasui, Hori et al. Nerve growth factor and associated nerve sprouting contribute to local mechanical hyperalgesia in a rat model of bone injury. *Eur Pain*. 16(7): 953-65, 2012

- Emanuelli et al. Nerve growth factor promotes angiogenesis and arteriogenesis in ischemic hindlimbs. *Circulation*. 106(17):2257-62, 2002
- Liu et al. Vatalanib decrease the positive interaction of VEGF receptor-2 and P2X2/3 receptor in chronic constriction injury rats. *Neurochem Int*. 60(6): 565-72, 2012
- Hori et al., Involvement of ion channels in muscle hyperalgesia in a new rat model of chronic post-ischemia pain. 14th world congress on Pain, PF258, Abstract, 2012

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Aye-Mon A, Hori K, Okuda H, Ozaki N, CCR2 upregulation in DRG neurons plays a crucial role in gastric hyperalgesia associated with diabetic gastropathy *Molecular Pain*, 14:1-13, 2018 査読有
 Nakagawa T, Hiraga S, Mizumura K, Hori K, Ozaki N, Koeda T; Topical thermal therapy with hot packs suppresses physical inactivity-induced mechanical hyperalgesia and up-regulation of NGF. *Journal of Physiological Science*, DOI 10.1007/s12576-017-0574-4, 2017 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

末梢動脈疾患に伴う虚血性疼痛のメカニズムの解明、堀紀代美、他、生理学研究所 2018 年研究会 生体サイババル戦略としての痛みの気候と意義 2018 年 12 月 13 日、自然科学機構 岡崎カンファレンスセンター (愛知県岡崎市)

Involvement of Nerve Growth Factor in Muscle Hyperalgesia in a Rat Model of Peripheral Arterial Disease. Hori K et al., 17th World Congress on Pain, 2018/09/13, Boston Convention and Exhibition Center, Boston

末梢動脈疾患に伴う冷痛覚過敏におけるイオンチャネルの関与、堀紀代美、他、第 39 回日本疼痛学会 2017 年 6 月 17 日、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

Cold-gated ion channels contribute to cold allodynia in a new rat model of peripheral arterial disease, Hori K et al., 16th World Congress on Pain, 2016/09/27, Pacifico Yokohama, Yokohama

Cold-gated ion channels involve in cold allodynia in a new rat model of peripheral arterial disease, Hori K et al., 第 50 回日本理学療法学会大会、2015 年 6 月 7 日、東京国際フォーラム (東京都)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kanazawa-u.ac.jp/lab/cat7-05.html>

<http://anatomy-2.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：尾崎 紀之

ローマ字氏名：OZAKI, Noriyuki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。