

平成30年 5月 7日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11304

研究課題名(和文) TRPV4を介した術後痛のメカニズム ―何が痛みのトリガーとなるか―

研究課題名(英文) TRPV4 in Postoperative Pain

研究代表者

城戸 幹太 (Kido, Kanta)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：40343032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：手術後の痛みは、未だ患者にとって最大の不安・恐怖の対象の一つであり、その成立機序を詳細に解明し、効果的な術後痛管理法を開発することが急務である。本研究では、ラット術後痛モデルを用いて、(1) 組織損傷がProtease activated factor-2 (PAR-2)を活性化し術後痛を誘発すること、(2) PAR-2活性化がさらにTRPV4を活性化すること、(3) 組織の浸透圧変化が、TRPV4の活性化に大きな役割を果たすこと、を証明し、これまで不明であった術後痛とTRPV4との関連性を見いだした。このことは、今後の術後痛管理に応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Postoperative pain is difficult to treat, despite effective postoperative analgesia, which improves patient satisfaction and decreases morbidity and mortality after surgery. To elucidate the mechanism of postoperative pain is necessary to develop new techniques. we hypothesized that: (1) incision induced the release of tryptase from mast cells or elastase from neutrophils that activate PAR-2; (2) the activation of PAR-2 sensitizes TRPV4; (3) local osmolarity changes in wounds stimulated TRPV4 and increased postoperative pain and inflammation. We finally demonstrated that osmolarity were increased in wounds for at least 48 hours after incision. In skin, TRPV4 contributed to hypersensitivity and paw edema after incision.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：術後痛 PAR-2 TRPV4

1. 研究開始当初の背景

患者に質の高い周術期医療を提供するためにもっとも重要な課題の一つが術後疼痛管理である。たとえ完璧な手術が行われても、術後の疼痛管理が不十分であれば、術後合併症の大きな誘因となり、患者の周術期 QOL や満足度は著しく低下、在院日数は延長することとなる。従って、ゴールドスタンダードな術後疼痛管理を確立することが急務である。1996年に Brennan らが開発したラット足底切開による術後痛モデルは、人の術後と非常によく似た経過をとり、多彩、複雑で不明な点が多い術後痛の発生メカニズム解明に飛躍的な進歩と発展をもたらした。様々な術後痛発症機序が解明されつつある中、近年 TRP チャネルファミリーが大きく注目されており、中でも TRPV1 および TRPA1 チャネルは、痛みとの関連性が強く示唆されている。一方我々のグループは、肥満細胞が術後痛成立に重要な役割を果たすことを報告した。この機序として、肥満細胞が放出するトリプターゼとそのレセプターである Protease-activated receptor-2 (PAR-2) の活性化が関与していることが考えられている。さらに近年、この PAR-2 と新しい TRP ファミリーとして発見された TRPV4 が密接に関係していることが分かってきた。TRPV4 は、機械刺激・熱刺激の他に、浮腫のような浸透圧変化に対するセンサーの役割を持つ非常にユニークなチャネルである。しかし、術後痛との関係を調べた報告はなく、その関与は不明である。もし、TRPV4 が PAR-2 活性化を介して術後痛成立機序の一因であることが確認できれば、術後痛の新たな治療戦略となる可能性を秘めている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、以下の術後痛成立機序を証明することである。

(1) 手術侵襲により組織に存在する肥満細胞や好塩基球からトリプターゼが放出される

(2) トリプターゼが PAR-2 受容体に結合し、活性化、PKC、A 経路を中心とした細胞内カスケードを誘導する

(3) TRPV4 チャネルが活性化する

(4) 一次求心性線維の機械及び熱刺激に対する反応の増強、および創部の浮腫を感知し痛みをさらに増強する

すなわち、PAR-2 活性化によって術後痛は増強するか、また遮断することによって痛みが減弱するかどうか、同様に TRPV4 活性化によって痛みが増強するか、また遮断することによって痛みが減弱するかどうか、さらに創部の浸透圧変化がどのように関与するかということラット術後痛モデルを用い、疼痛行動評価および皮膚神経標本による単一神経記録によって確認することを目的とした。

3. 研究の方法

対象：雄 SD ラット (体重 250-300g) 薬剤：PAR-2 agonist として、SLIGRL-NH₂ または PBS-vehicle / PAR-2 antagonist として、ENMD1068 または PBS-vehicle / TRPV4 antagonist として、HC-067047 または PBS-vehicle .

(1) PAR-2 の術後痛への関与
術後痛モデルにおける PAR-2 antagonist の前処置効果

ENMD1068 を足底部に皮下注射して、30 分後に足底切開、経時的に自発痛の観察および機械刺激、熱刺激に対する反応を評価した。

PAR-2 agonist による侵害受容感作

SLIGRL-NH₂ を足底部に皮下注射して、経時的に自発痛の観察および機械刺激、熱刺激に対する反応を評価した。

in vitro single fiber recording

ラット足底皮膚と後脛骨神経を取り出し、Synthetic Interstitial Fluid で灌流しているチャンパー内に固定。神経束を単一神経記録ができるまで顕微鏡下に裂き、ガラスロッドを用いて受容野を探索。受容野に PAR-2 agonist もしくは PBS を投与後、一次求心性線維の自発活動、機械刺激および熱刺激に対する反応を記録した。

(2) TRPV4 の術後痛への関与
術後痛モデルにおける TRPV4 antagonist の前処置効果

HC-067047 を足底部に皮下注射して、30 分後に足底切開、経時的に自発痛の観察および機械刺激、熱刺激に対する反応を評価した。30 分後に足底切開、疼痛評価を行った。

(3) 浸透圧変化の術後痛への関与
PAR-2 agonist + 高・低浸透圧液投与による自発痛増強効果

SLIGRL-NH₂ を高浸透圧液 (2%NaCl) および低浸透圧液 (蒸留水) 下に足底部に注射し自発痛を評価。

足底切開部における組織浸透圧の経時的变化

切開部の滲出液を採取し、Osmometer により浸透圧を測定。

切開後の足底部浮腫の経時的变化
切開側

in vitro single fiber recording

浸透圧変化に対する反応を正常群および切開群で比較、さらに antagonist により抑制効果を観察した。

4. 研究成果

(1) PAR-2 の術後痛への関与

PAR-2 の antagonist である ENMD1068 の前投与は、ラット足底切開後の早期の自発痛、機械的アロディニア、熱痛覚過敏をそれぞれ抑制した (図 1)。また、PAR-2 agonist である SLIGRL-NH₂ 足底注射は、注射後即時の自発痛、痛覚過敏、熱痛覚過敏を惹起した (図

2)

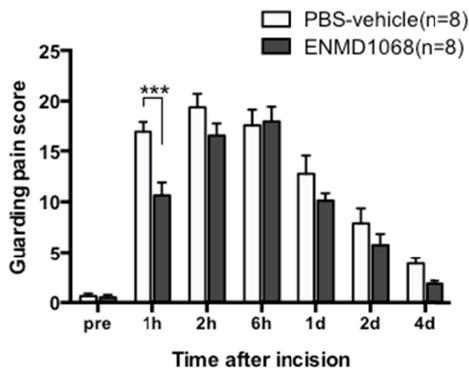


図1. 自発痛の抑制効果

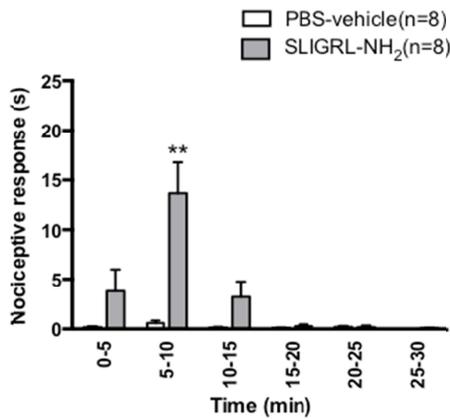


図2. Agonist による自発痛の誘発

さらに、単一神経記録においても、SLIGRL-NH₂ は PBS に比べ、神経の自発活動を増加させた (図3)。機械刺激や熱刺激に対する反応は増強しなかった。

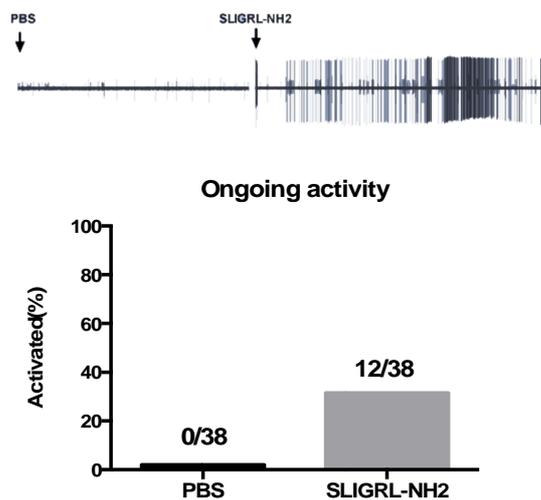


図3. サンプル例および反応した神経の割合

(2) TRPV4 の術後痛への関与
TRPV4 antagonist の HC-067047 前投与により、術後1日まで自発痛、機械刺激・熱刺激に対

する反応が抑制された。

(3) 浸透圧変化と術後痛

SLIGRL-NH₂ の足底投与は、高・低浸透圧 (Hypo/Hyper) 液同時投与下では、自発痛(足を振る、咬む)を約4倍に増強した(図4)。創部の浸透圧は術後2時間後から増強し、1日に約450mOsmのピークを迎え、2日目にはベースラインに戻った(図5)。このことは、初期の浮腫状態が水分の豊富な低浸透圧状態ではなく、血管からタンパク質が漏出している、高浸透圧状態であることを示した。一方創部の浮腫自体は、術後6時間でほぼピークとなり、約7日間続いた(図6)。このことは、創部の浸透圧変化と浮腫状態が同系列ではないことを示している。

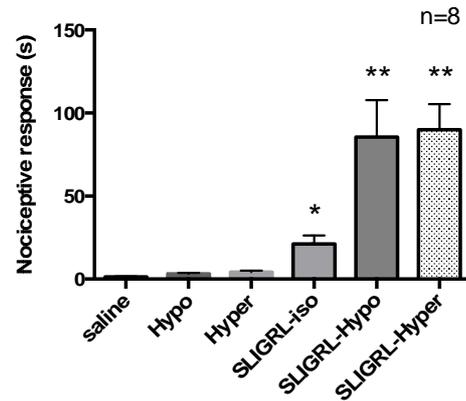


図4. 浸透圧変化による PAR-2 agonist の作用増強効果

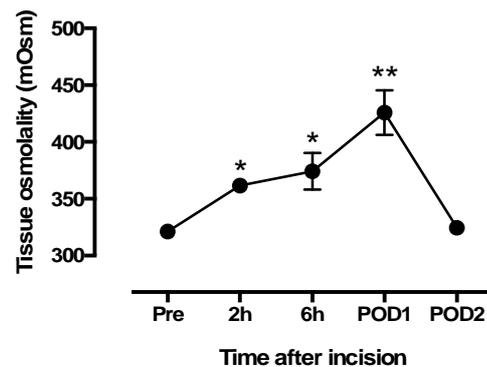


図5. 足底切開部の浸透圧変化

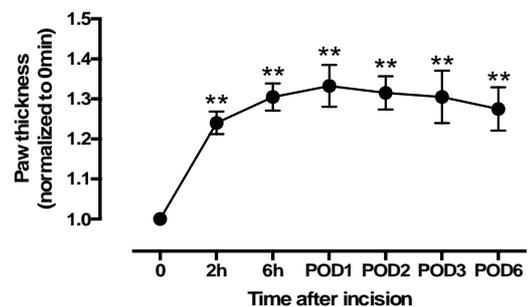


図6. 足底部浮腫の経時的変化

さらに、単一神経記録において、コントロー

ル群は高浸透圧液に対してほとんど変化を示さなかったが、一方切開群では、約7割の一次求心線維が自発活動を増加させた。この反応は可逆的であり、wash outにより、活動はベースラインまで回復した。このことは、切開により浸透圧チャンネルである TRPV4 が活性化されていることを示唆している。この確認のため、TRPV4 antagonist を投与すると、この反応はほぼ抑制された。機械刺激や熱刺激に対する反応は、データが完全ではないもののコントロール群と切開群で差は無いようである。

以上をまとめると、手術切開により創部に放出される肥満細胞や白血球由来のトリプターゼやエラスターゼが PAR-2 を活性化し術後痛を生じること、さらに創部の浸透圧変化およびそれに伴う TRPV4 の活性化がその痛みを増強すること、PAR-2 / TRPV4 それぞれのアンタゴニストを前投与することによりラット術後痛モデルにおいて、自発痛、熱・機械刺激に対する反応を抑制すること、を確認した。これは、切開により一次求心性線維上の PAR-2 活性化、引き続いて起こる TRPV4 チャンネルの Sensitization、および組織浸透圧変化による TRPV4 刺激により、術後早期の痛みにもこれらの機序が関与していることが示唆された。

今後 DRG 細胞のパッチクランプによる TRPV4 発現細胞の浸透圧変化に対する反応性をコントロール群および切開群で比較すること、免疫組織学的手法により TRPV4 チャンネルの発現増加、などの検索を行い、さらに詳細に検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Masaki E, Mizuta K, Ohtani N, Kido K. Early Postoperative Nociceptive Threshold and Production of Brain-Derived Neurotrophic Factor Induced by Plantar Incision Are Not Influenced with Minocycline in a Rat: Role of Spinal Microglia, Neurosignals, 査読有, 24(1), 2016, pp. 15-24, DOI: 10.1159/000442608

〔学会発表〕(計 2 件)

Kido K, Masaki E. Involvement of TRPV4 and local osmolarity in incisional pain in the rat. SFN 2017, Nov.12 2017, Washington D.C. (USA).

Kido K, Masaki E. Osmolarity changes contribute to nociceptive sensitization induced by activation of Protease-

Activated Receptor 2 (PAR-2) in the rat. SFN 2015 Oct.18 2015, Chicago (USA).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

城戸 幹太 (KIDO, Kanta)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号：40343032

(2)研究分担者

正木 英二 (MASAKI, Eiji)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：40221577

安田 真 (YASUDA, Makoto)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号：70431591

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()