

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18252

研究課題名(和文)低酸素応答を介した病的疼痛の重症化・慢性化の機序の解明

研究課題名(英文)Elucidating the Relevance of Pathological Chronic Pain and Hypoxic Response

研究代表者

寅丸 智子 (TORAMARU, Tomoko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：70594612

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：重要組織では、組織低酸素の際、プロリン水酸化酵素(PHD:prolyl hydroxylase domain)を介した低酸素応答機構が発動する。動物の術後痛モデルでも、手術創部における組織低酸素が実証されているが、末梢組織における低酸素応答機構の有無、および、術後痛への影響は不明である。PHD阻害による低酸素応答活性化は、マウス術後痛モデルにおいて、術後痛への影響は認めなかったものの、手術に伴う局所発汗障害を改善した。PHD阻害は、交感神経保護作用を介して、術後の局所自律神経障害に対して保護的に働く可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、マウス術後痛モデルの創部神経束においてPHDが存在することを突き止めた。PHD阻害は術後痛には影響なかったものの、術後局所発汗障害を改善した。PHD阻害は、交感神経保護作用を有し、予防的なPHD阻害が術後自律神経障害に対し保護的に働く可能性が示唆された。

創部の強い痛みや自律神経障害が慢性的に続く複合性局所疼痛症候群(Complex regional pain syndrome: CRPS)では、術後創部における虚血が発症の一因とされている。CRPS患者の病理組織は本研究での知見に合致する点が見受けられ、PHD阻害が術後CRPSへの進展を予防する可能性も示唆された。

研究成果の概要(英文)：The involvement of hypoxic response mechanisms in the local functional impairments in surgical wounds is unclear. This study characterised the tissue hypoxia in the surgical wound and investigated the role of prolyl hydroxylase domain enzymes (PHD) inhibitor, on postoperative local functional impairments in a murine model of deep hind paw incision.

Prominent tissue hypoxia was detected within axons in nerve bundles underneath the wounds. Perioperative PHD inhibition failed to ease spontaneous pain-like behaviors but it mitigated local sudomotor impairment after surgery. Upregulation of sympathetic innervation in eccrine glands was observed in the PHD inhibited skins in accordance with the in vitro study where PHD inhibition promoted neurite growth of PC12 cells. These results suggest a possible involvement of hypoxic response mechanisms in the progression of postoperative functional impairments such as local sudomotor dysfunction, via regulation of sympathetic innervation.

研究分野：麻酔学

キーワード：麻酔学 低酸素応答 プレコンディショニング 慢性痛 複合性局所疼痛症候群

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性痛は国民の約五分の一が有する国民病であり、多くの患者に精神的・身体的苦痛による生活水準の低下や社会復帰の遅れをもたらす、社会に甚大な被害を与える。疼痛の重症化・慢性化の機序に関しては広く研究されてきたが、いまだ満足いく治療法の確立には至っておらず、より多角的な機序の解明とそれに基づく新たな疼痛管理法の展開が急務である。

低酸素応答は、転写因子 hypoxia-inducible factor (HIF) の活性化による関連遺伝子の発現を介して個体の低酸素環境への順応をもたらす (Rey and Semenza, *Cardiovasc Res* 2010;86:236-42)。申請者らのグループは、HIF が PHD2 によって負に制御されており (Minamishima et al, *Blood* 2008;111:3236-44)、PHD2 が失活した細胞では HIF が活性化し、低酸素応答が恒常的に観察されるようになることを見出した (Minamishima and Kaelin, *Science* 2010;329:407)。興味深いことに、最近、侵害受容体の一つである TRPA1 が PHD によるプロリン基の水酸化を介してチャネル機能の修飾を受けていることがマウス虚血性肢痛モデルにて報告されており (So et al, *Sci Rep* 2016;6:23261, Miyake et al, *Nat Commun* 2016;7:12840)、これは、PHD を介した低酸素応答が、生体に局所低酸素を知らせるために疼痛シグナルを増幅していると解釈できる。また、炎症性・神経障害性疼痛などのより一般的な病的疼痛においても、局所低酸素が関与していることが報告されている (Lim et al, *J Neurosci* 2015;35:3346-59)。しかしながら、これらの研究では、PHD と病的疼痛の重症化・慢性化との関係性や、その治療法についてはほとんど検討されていない。

そこで本研究では、低酸素応答を介した痛み増幅は、臓器・組織損傷を個体に知らせるための普遍的な機序であるとの仮説を立て、「臨床的に重要な種々の病的疼痛において、PHD を中心とした低酸素応答が重症化・慢性化に関係しているのではないか」という学術的問いを核とし機序の解明と新たな疼痛管理法の展開を模索する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞内酸素濃度センサー・PHD に着目し、臨床的に重要な種々の病的疼痛の重症化・慢性化との関係性を明らかにする事である。各種の病的疼痛マウスモデルでの低酸素応答関連分子の発現・活性を明らかにし、局所低酸素を制御することによる新たな疼痛管理法を展開する。

3. 研究の方法

(1) 健常時及び病的疼痛時の痛覚神経系での低酸素応答関連分子の発現・活性解析

痛覚神経系での低酸素応答関連分子の発現に関する報告は限られている。そこでまず、野生型マウスにおいて、痛覚神経系(末梢神経終末、後根神経節、脊髄後角)での PHD・HIF 及びその下流にある低酸素応答関連分子の発現・活性を生化学的・免疫組織学的に解析する。

次に手術後痛モデル(Brennan モデル)、炎症性関節痛モデル(complete Freund's adjuvant 関節内投与モデル)、神経障害性疼痛モデル(spared nerve injury モデル)の病的疼痛マウスモデルにおいて、痛覚神経系での局所低酸素を hydroxyprobe、乳酸測定及び組織切片を用いた MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight) イメージング質量分析により可視化する。さらにこれらの部位での PHD、HIF 及びその下流にある低酸素応答関連分子の発現・活性を生化学的・免疫組織学的に解析する。また、病的疼痛時の TRPA1 の水酸化状態を、ヒドロキシプロリン抗体を用いた免疫沈降法により調べる。

(2) 低酸素応答活性化モデルを用いた病的疼痛時の低酸素応答関与の実証

Phd2 条件付き遺伝子破壊マウス (*Phd2 flox/flox*) と痛覚神経特異的プロモーター *Nav1.8-Cre* マウスを交配することにより、侵害受容体に特異的な“低酸素応答活性化モデル”を作成する。また、野生型マウスに PHD 阻害薬 (FG4592) を投与して、全身または局所で低酸素応答をオンにしたモデルも作成する。これらのマウスのベースライン及び各種の病的疼痛マウスモデルでの疼痛閾値の変化を von Frey 試験及びホット・コールドプレート試験で調べ、低酸素応答の病的疼痛への関与を実証する。自発痛は dynamic weight bearing システムを用いて客観的に評価し、対照群マウスと比較する。さらに痛覚神経系での p38 のリン酸化、CGRP、TRPA1 等の発現を生化学的・免疫組織学的に評価し、低酸素応答の疼痛の重症化・慢性化との関係性を裏付ける。

(3) 局所低酸素応答を標的とした新たな疼痛管理法の展開

最後に局所低酸素応答を制御することによる新たな疼痛管理法の展開を試みる。上記各種の病的疼痛マウスモデルにおいて、低酸素応答のエフェクター分子(HIF や TRPA1)の阻害薬を全身・局所的に投与して、急性痛への反応性及び慢性痛への移行に対する効果を評価する。さらに、局所麻酔薬、高濃度酸素投与、血管拡張薬や創傷治癒領域で注目を集めている OxyBand Wound Dressing™ (OxyBand Technologies, Inc.)、Oxycyte® (Oxygen Biotherapeutics, Inc.) などの局所酸素デリバリーシステムを用いた局所低酸素の改善による疼痛管理効果を各種の病的疼痛マウスモデルで検証することで、新たな疼痛管理法の展開につなげる。

4. 研究成果

マウス術後痛モデルの創部にて、皮下神経束内で顕著な組織虚血、および、軸索で PHD2 の有意な発現上昇を認めた (寅丸智子ら, マウスモデルによる虚血肢痛における低酸素応答関連分子の関与の検討. 第 67 回日本麻酔科学会学術集会, 2020 年 7-8 月, 神戸)。しかし、PHD 阻害は疼痛様行動に影響は与えなかった (寅丸智子ら, プロリン水酸化酵素阻害はマウス手術後痛モデル創部で神経障害を惹起する. 第 68 回日本麻酔科学会学術集会, 2021 年 6 月, 神戸)。一方、術後 3 週の足底組織で、PHD 阻害により、創部付近の汗腺組織に交感神経のマーカーである tyrosine hydroxylase (TH) 陽性線維の発現上昇が認められた。

そこで、「低酸素応答機構の活性化は手術創部の局所自律神経機能に影響を与えるか？」を research question とし、手術創部自律神経障害に対する PHD 阻害の効果を検証した。術後 3 週間の時点で、創傷治癒は完了していたにも関わらず、手術創部では、ストレス誘発性発汗の有意な低下が認められた。一方、PHD 阻害による低酸素応答活性化はそれを改善した。

交感神経系細胞に対する PHD 阻害の効果を検証した *in vitro* 実験では、濃度依存的な HIF-1a の蓄積と核内への移行、および、神経突起の伸長が認められた。同様に手術創部の汗腺組織における交感神経に対する PHD 阻害の効果を検証した *in vivo* 実験では、TH シグナルの有意な低下を認めた。一方、PHD 阻害による低酸素応答活性化はそれを改善し、発汗アッセイと一致する結果となった。

ストレス性発汗は交感神経線維を介したシグナルで生じるため、免疫染色の結果と併せて、この術後発汗障害の原因は汗腺周囲の交感神経線維の密度低下によるものと考えた。創部の強い痛みや発汗・血流異常などの自律神経障害が慢性的に続く複合性局所疼痛症候群 (Complex regional pain syndrome: CRPS) では、術後創部における虚血、例えば橈骨骨折後のギプス固定などが発症の一因と提唱されており、CRPS 患者の病理組織では汗腺周囲の交感神経線維の減少が認められることから、本研究での知見に合致する点が見受けられた。本研究では、*in vitro*, *in vivo* で PHD 阻害薬投与が交感神経の神経成長を促進する結果が得られたが、低酸素応答機構と交感神経の関連については、過去にも、交感神経機能に重要な TH が、HIF-1a による転写制御を受けることや、HIF-1a のノックアウトマウスで交感神経系発達が傷害されるなどの強い関連性が報告されている。PHD 阻害による低酸素応答活性化は交感神経に保護的に作用し、それにより術後局所自律神経障害を抑制する可能性が示唆された。術後 CRPS との共通点を考慮すると、PHD 阻害が術後 CRPS への進展を予防する可能性も示唆された (寅丸智子ら, プロリン水酸化酵素阻害による低酸素応答活性化はマウス術後痛モデルでの創部自律神経障害を改善する. 第 69 回日本麻酔科学会学術集会 2022 年 6 月, 神戸, 優秀演題)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 寅丸智子, 加藤純悟, 魯方琳, 曲德泰, 南嶋しづか, 森崎浩
2. 発表標題 マウスモデルによる虚血肢痛における低酸素応答関連分子の関与の検討
3. 学会等名 第67回日本麻酔科学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 寅丸智子, 加藤純悟, 魯方琳, 藤田治人, 森崎浩
2. 発表標題 プロリン水酸化酵素阻害はマウス手術後痛モデル創部で神経障害を惹起する
3. 学会等名 第68回日本麻酔科学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寅丸智子, 加藤純悟, 魯方琳, 藤田治人, 森崎浩
2. 発表標題 プロリン水酸化酵素阻害による低酸素応答活性化はマウス術後痛モデルでの創部自律神経障害を改善する
3. 学会等名 第69回日本麻酔科学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------