

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592276

研究課題名(和文) 神経傷害性疼痛における生理活性脂質の役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of bioactive lipids in neuropathic pain

研究代表者

伊藤 伸子 (ITO, NOBUKO)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80332609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：強力な白血球活性化作用を持つロイコトリエンB4 (LTB4) とその受容体BLT1の急性痛への関与について、BLT1遺伝子欠損マウスを用いて研究を行った。ホルマリン足底注入による急性痛モデルでの疼痛行動は、BLT1遺伝子欠損マウスで有意に減弱していた。脊髄での痛覚感作に関わる急性活性化因子CREBの活性化がBLT1欠損マウスで減弱し、またホルマリン注入局所の炎症所見が低下していた。さらにBLT1拮抗薬投与にて疼痛行動の減弱が認められた。急性痛病態形成においてLTB4-BLT1シグナルが局所の炎症反応とそれに続く脊髄での痛覚感作両方に関与している可能性と、BLT1拮抗薬の有効性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Leukotriene B4 (LTB4) is a potent lipid mediator enhancing recruitment and activation of neutrophils, which is a common feature of inflammation and tissue injury. We examined the involvement of LTB4 in acute pain models using LTB4 receptor (BLT1) deficiency mice. We found that BLT1 deletion reduced formalin-induced pain behaviors, peripheral inflammation and activations of Cyclic AMP-responsive element binding protein (CREB) in the dorsal horn. Activation of CREB in the spinal cord in response to peripheral noxious stimulation is known as an initial important step for central sensitization. Pretreatments of BLT1 antagonist were also effective for formalin-induced pain behaviors. LTB4-BLT1 signaling may contribute to not only peripheral inflammation but also the sensitization of nociceptors during persistent pain. The involvement of LTB4-BLT1 signaling is a key component of pain mechanisms and a powerful target for therapeutic intervention for acute and persistent pain state.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：脂質 炎症 疼痛学

1. 研究開始当初の背景

様々な刺激により細胞膜より遊離される生理活性脂質の中で、プロスタグランジンE2 (PGE2) についてはその受容体欠損マウスや PGE2 合成酵素欠損マウスの解析から、様々な神経活動で産生され、炎症性疼痛に大きく関わっていることが分かっている。一方、PG 類と同様に細胞膜アラキドン酸より産生されるロイコトリエン B4 (LTB4) については強力な白血球活性化作用を持つ性質から、喘息や関節リウマチの病態形成への関与が高親和性受容体 BLT1 欠損マウスを用いた研究から解明されている。しかし、疼痛における役割は明らかでなく、BLT1 欠損マウスで疼痛反応は減弱するのか、解明を試みた。

2. 研究の目的

強力な白血球活性化因子 LTB4 とその受容体 BLT1 のシグナルが神経因性疼痛や炎症性疼痛の病態形成にどのように関与するのかを、脊髄レベルでの分子変化と末梢局所での炎症変化を指標に解明する。

3. 研究の方法

LTB4-BLT1 シグナリングの急性痛に対する役割について主として研究を進めた。

(1) 急性疼痛モデル (ホルマリンテスト) 脊髄での急性期炎症因子 pCREB の発現解析

ホルマリン足底注入による疼痛行動のうち末梢から脊髄への痛覚伝導の増強を示す第 II 相の疼痛反応が、BLT1 欠損マウスで野生型マウスと比較して有意に減弱していたことが先行研究により観察されていた。そこで脊髄での急性期炎症因子 pCREB の発現変化を免疫染色にて解析した。BLT1 欠損マウス (12~14 週令雄性マウス、n=8、以下 BLT1KO 群) 及び野生型マウス (12~14 週令雄性マウス、n=8、以下 WT 群) の右足底皮下に 30G 針を用いて 5%ホルマリン溶液 10ul を投与 60 分後、ネブタールによる深麻酔下 4%パラホルムアルデヒドによる灌流固定を行った。腰部脊髄を摘出し、クライオスタットにて凍結切片を作成した。10%BSA によるブロッキング後、pCREB:リン酸化 CREB 抗体による免疫染色を行い、脊髄後角における pCREB 陽性神経細胞数をカウントし、BLT1KO 群、WT 群について比較解析した。

(2) 急性疼痛モデル (ホルマリンテスト) での局所炎症状態の比較

容積変化: BLT1 欠損マウス (12~14 週令雄性マウス、n=6、以下 BLT1KO 群) 及び野生型マウス (12~14 週令雄性マウス、n=8、以下 WT 群) についてホルマリンテスト前とホルマリンテスト 60 分後の足(踝以下)容積変化をプレシスモメーターにて測定比較した。血管透過性変化: ホルマリン投与前にエバンスブルーを腹腔内投与し、ホルマリン投与 60 分後の足部へのエバンスブルー浸出を測定した。

(3) BLT1 拮抗薬 ONO-4057 の効果

12~14 週令雄性マウスに BLT1 拮抗薬 ONO-4057 を前投与し、ホルマリンテストを行った。ONO-4057 測定経路として腹腔内投与、足底注入投与、脊髄内投与の 3 経路について行い、溶媒前投与群と比較解析した。

4. 研究成果

(1) 急性疼痛モデル (ホルマリンテスト) での脊髄急性期炎症因子 pCREB の発現解析

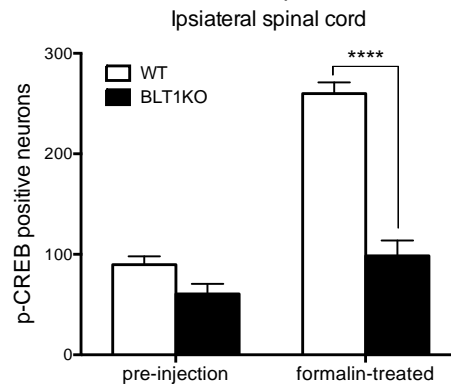


図1 BLT1 群及び WT 群 ホルマリン投与前後での脊髄後角における pCREB 陽性神経細胞の比較 \*\*\*\* p<0.0001 vs. WT n=6  
ホルマリン投与 60 分後の脊髄後角にて pCREB 陽性神経細胞数が投与側、非投与側とも BLT1KO 群にて有意に低下していた。

(2) 急性疼痛モデル (ホルマリンテスト) での局所炎症状態の比較

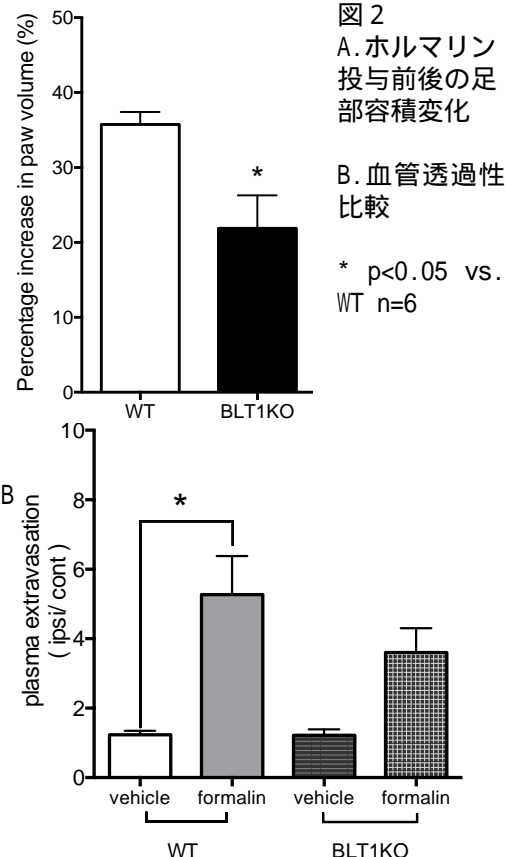


図2  
A. ホルマリン投与前後の足部容積変化  
B. 血管透過性比較  
\* p<0.05 vs. WT n=6

ホルマリン足底投与後の足部容積変化はBLT1KO群で有意に低かった。またエバンスブルーによる血管透過性測定にても、WT群ではホルマリン非投与側と比較し、有意な血管透過性亢進が認められたが、BLT1KO群では亢進は見られたが有意な増加ではなかった。

(1)(2)の結果より、BLT1遺伝子欠損により、脊髄後角での痛覚感作形成シグナル増強作用が低下していたこと、末梢局所での炎症作用の両方が抑制されていることが分かった。

### (3) BLT1拮抗薬ONO-4057の効果

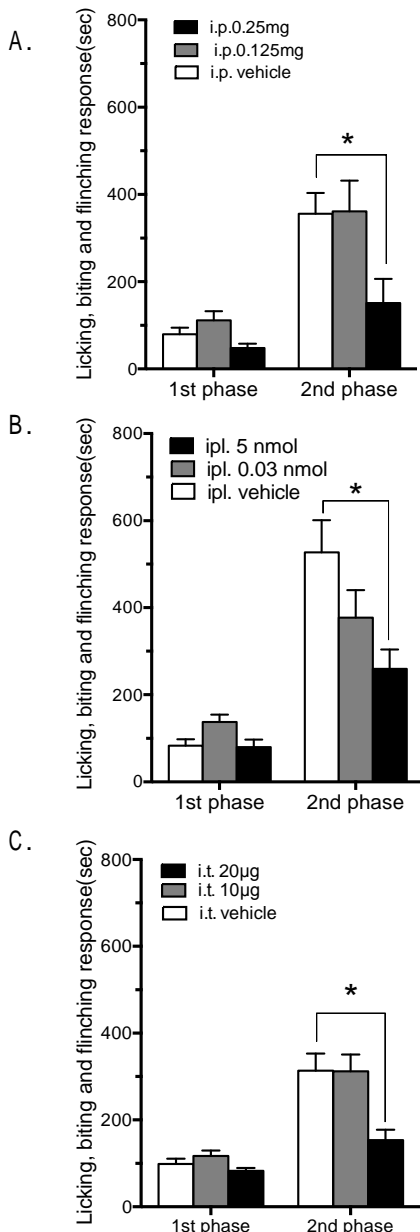


図3 ONO-4057前投与のホルマリンテストにおける疼痛行動変化  
A:腹腔内投与 B:足底投与 C:脊髄腔内投与  
\* $p < 0.05$  vs. Vehicle  
いずれの投与経路でも第II相での疼痛行動は有意に減弱していた。

本研究の結果、急性痛病態形成においてLTB4-BLT1シグナルが末梢局所での炎症反応とそれに続く脊髄神経での痛覚感作両方に関与している可能性と、BLT1拮抗薬の急性痛における有効性が示唆された。

今後は、より臨床状態に近い疼痛モデルである術後痛や末梢神経障害モデルでのLTB4-BLT1シグナルの役割についてさらに研究を進めていきたい。特に、脊髄レベルでのBLT1受容体の役割やグリア細胞でのLTB4産生の可能性について、探求していきたいと考えている。

### 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 0件)

〔学会発表〕(計 4件)

伊藤伸子、浅原美保、室屋充明、内田寛治、張京浩、山田芳嗣 ロイコトリエン B4 受容体拮抗薬及び好中球枯渇状態のマウス下肢虚血再灌流後肝傷害への影響 第58回日本麻酔科学会 2011年5月19日 神戸

浅原美保、伊藤伸子 急性炎症性疼痛モデルにおける疼痛行動と脊髄後角でのCREB活性化はLTB4受容体欠損により減弱する 第34回日本疼痛学会 2012年7月21日、熊本

Miho Asahara, Nobuko Ito, Yoshitsugu Yamada, Takehiko Yokomizo, Motonao Nakamura, Takao Shimizu Formalin and Capsaicin induced nociceptive responses are attenuated in leukotriene B4 receptor (BLT1) deficiency mice 14<sup>th</sup> World Congress on Pain 2012年8月30日 Milan, Italy

浅原美保、伊藤伸子、山田芳嗣 ロイコトリエン B4 受容体拮抗薬は急性炎症性疼痛モデルにおける疼痛行動を減弱させる 第60回日本麻酔科学会 2013年5月23日 札幌

〔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

伊藤伸子 ( ITO NOBUKO )  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：80332609

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：