

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790575

研究課題名(和文)新たに開発した動物モデルを用いた末梢動脈疾患に伴う疼痛機序の解明

研究課題名(英文) Involvement of ion channels in muscle hyperalgesia, intermittent claudication and cold allodynia in a new 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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：末梢動脈疾患に伴う虚血性疼痛のメカニズムを解析するために動物モデルを開発し、皮膚や筋の痛みに関与する因子を調べた。ラットの左総腸骨および左腸腰動脈を結紮するし左下肢の血流を阻害すると、慢性的な筋の機械的痛覚過敏、間歇性跛行および冷痛覚過敏が認められた。これらの筋痛や冷痛覚の亢進に対し、イオンチャネルの関与を調べたところ、TRPV1、TRPM8は関与しないが、筋痛にはP2X3,2/3やASICs、冷痛覚にはTRPA1の関与が確認された。本モデルは末梢性動脈閉塞症の痛みのメカニズムの解明に有用であり、末梢動脈疾患における痛覚の亢進にはP2X3,2/3、ASICs、TRPA1が重要と思われた。

研究成果の概要(英文)：Aim: To demonstrate neuronal mechanisms underlying pain associated with peripheral arterial disease (PAD), we investigated the role of ion channels in a newly developed rat model of PAD. Methods: We ligated the rat's left common iliac and iliolumbar arteries completely. Then, we assessed mechanical, thermal, cold sensitivity and intermittent claudication on behavioral testing. We also evaluated effects of antagonists to TRPV1, P2X3,2/3 ASICs, TRPA1 and TRPM8 on behavioral responses. Result: Chronic mechanical hyperalgesia of the muscle, reduced walking distance intermittent claudication and cold allodynia was observed after ligation. Antagonists against P2X3,2/3 and ASICs suppressed both muscle hyperalgesia and intermittent claudication and antagonists against TRPA1 suppressed cold allodynia in PAD rats. Conclusions: P2X3,2/3,ASICs and TRPA1 may play important roles in this model, and thus may be promising therapeutic targets for chronic ischemia-induced pain 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 間歇性跛行 冷痛覚過敏 ASIC3 P2X3

## 1. 研究開始当初の背景

組織の虚血は疼痛をもたらす、心臓領域では、冠動脈の狭窄・閉塞は虚血性心疾患として心、胸部に耐え難い痛みを引き起こす。四肢の末梢領域においても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、歩行時や階段を上がる際もしくは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。

近年、痛みの受容器への刺激を電気信号に変換する数多くのイオンチャンネルがクローニングされ、疼痛の分子メカニズムが明らかにされつつあり、申請者も薬剤起因性の神経因性疼痛へのイオンチャンネルの関与について報告し、分子メカニズムの一端を明らかにした(Hori et al., 2010)。

虚血性疼痛は罹患部の代謝性アシドーシスによるpHの低下との関連が知られている。一方、組織のpHの低下で活性化されるイオンチャンネルであるTRPV1、ASIC3は痛覚との関連が数多く報告されている。また、心臓の虚血性疼痛にはASIC3やATP受容体のP2X<sub>3</sub>の関与が報告されている(Hattori et al., 2009, Wang et al., 2009)。さらに、冷刺激により活性化されるイオンチャンネルTRPA1、TRPM8の冷痛覚との関連も盛んに報告されてきた(Knowlton et al., 2010)。これらのイオンチャンネルが虚血性疼痛に関与すると予想される。

PAD患者に見られる疼痛のコントロールは、患者の苦しみを緩和するだけでなく、運動療法に伴う筋痛症状を緩和することにより治療効果の促進や疼痛による活動性の低下が引き起こす合併症の予防につながる。PADは疾患頻度が高く、患者数は増加しており、効果的な治療法の開発は患者の社会復帰を促し、その経済効果は計り知れない。高齢者に多いPADの治療法の開発が進むことで、心身ともに健やかで長寿を迎える人類共通の目標達成につながることも期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、下肢の虚血に起因する筋の痛覚過敏に関与するイオンチャンネルおよび成長因子を検索することにより、PADで見られる虚血性疼痛の分子メカニズムを明らかにし、その効果的な治療法につながる分子基盤を構築することを目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) 下肢虚血モデルラットの作成と行動評価

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(arterial ligation: AL群)。対照群では動脈の露出のみ行う(sham群)。

動脈結紮処置直後、血管造影により結紮処置より末梢部への血流の阻害を確認する。また、処置後、レーザードップラー血流計にて下肢の血流量を、表面温度計にて足部の皮膚温を確認する。

動脈結紮処置による痛覚への影響を調べるため、皮膚および筋の機械刺激、熱刺激および冷刺激に対する疼痛行動を評価する。皮膚の機械刺激に対する反応はvon Frey式痛覚測定装置、筋の機械刺激に対する反応は2.6mm以上の太い径のプローブを装着した圧刺激鎮痛効果装置、熱刺激に対する反応は足底熱刺激測定装置を用いる。冷刺激に対する反応はアセトンの足底噴射によるアセトン試験と温・冷型痛覚計装置を用いて30度から2度へ徐々に下降するプローブによる温度刺激を与えて逃避する温度を調べる試験の2種を施行する。また、間歇性跛行を評価するため小動物用トレッドミルを用いて歩行能力テストを行う。

### (2) 皮膚および筋組織の組織学的評価

動脈結紮による筋組織の壊死および再生の有無を確認するため、ラットの下腿の皮膚や腓腹筋を組織学的に染色して観察する。

### (3) 行動薬理学的評価

動脈結紮によって痛覚が亢進したラットにTRPV1の拮抗薬(AMG9810)、P2X<sub>3</sub>の拮抗薬(A-317491)、ASICsの拮抗薬(Amiloride)を投与して筋の機械的痛覚過敏や間欠性跛行への効果を確認する。また、TRPA1の拮抗薬(HC-030031)およびTRPM8の拮抗薬(AMTB)を投与して冷痛覚行動の変化を確認する。

### (4) 後根神経節(DRG)の免疫組織学的評価

動脈結紮によって痛覚が亢進したラットのDRGにおいて、免疫組織化学的に筋の知覚神経におけるイオンチャンネルTRPV1、P2X<sub>3</sub>、ASIC3、TRPM8、TRPA1の発現を検索する。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とイオンチャンネル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。

## 4. 研究成果

動脈結紮処置を受けたAL動物は運動麻痺や極端な前後肢の虚弱、および運動量の低下は認められなかった。

AL動物の処置直後の血管造影の実施により、左下肢への血流が阻害されていることが確認された。AL群では処置後6週まで皮膚

血流の減少が、4 週まで皮膚温の低下が確認された。

AL 群では動脈結紮処置後の行動評価より、皮膚の機械的痛覚過敏は 1 週まで、筋の機械的痛覚過敏は 3 週まで認められ、間欠性跛行は 12 週まで続いたが、熱刺激に対する反応に変化は認めなかった。これらは予備的に得ていたデータと同様の結果となった。また、冷刺激に対する反応については、足底の皮膚でアセトンによる冷刺激による反応に変化は認めなかったが、30 度から 2 度へ徐々に下降する温度刺激を与えたところ、処置後 7 日後から低温に対する冷痛覚が亢進した状態である冷アロディニアが認められ、14 日目まで続いた (図 1)。

組織学評価より、筋の HE 染色では処置後 4 日目で筋線維周囲の組織浸潤や壊死像、および中心核細胞などの筋の再生像が観察されたが、14 日目にはこれらは認められず、回復していた。皮膚については、皮膚の機械的痛覚過敏が認められた 4 日目も冷アロディニアが認められた 10 日目も AL 群と sham 群で変化は認められなかった。動脈結紮処置後の虚血の評価、行動評価、および皮膚と筋の組織学評価の結果のまとめを図 2 に示す。

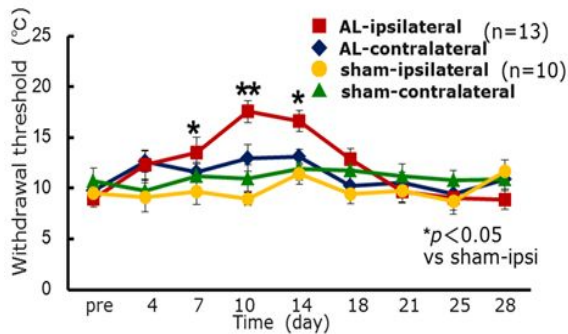


図1 低温度刺激に対する逃避閾値

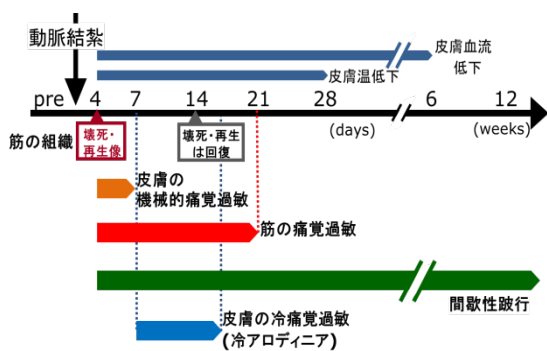


図2 下肢虚血モデルラットの痛覚閾値の変化のまとめ

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、TRPV1 拮抗薬は効果を示さなかったが、P2X<sub>3,2/3</sub> ならびに

ASICs 拮抗薬は筋の痛覚過敏を抑制し、ASICs 拮抗薬は間欠性跛行を部分的に抑制した。

皮膚の冷アロディニアが認められる 10 日目の行動薬理学評価より、TRPM8 拮抗薬は効果を示さなかったが、TRPA1 拮抗薬は皮膚の冷アロディニアを抑制した (図 3)。

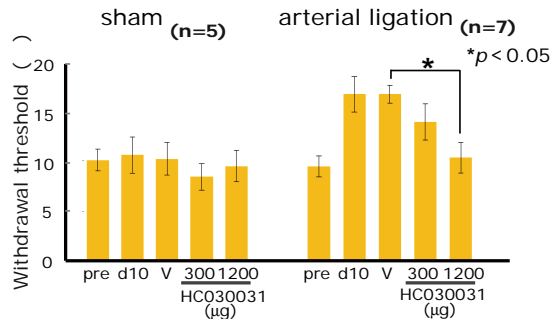


図3 TRPA1拮抗薬に対する行動薬理学評価

筋の機械的痛覚過敏のみ認められる 2 週目 (14 日) の DRG の免疫組織学的評価より P2X<sub>3</sub> の発現総数に変化は認めなかった。

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 の痛み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、P2X<sub>3,2/3</sub>、ASICs の関与が示唆され、冷痛覚過敏には TRPA1 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 RL et al. Secondary prevention and mortality in peripheral artery disease: National Health and Nutrition Examination Study, 1999 to 2004. *Circulation*. 124: 17-23, 2011
- Hori K. et al., Upregulations of P2X<sub>3</sub> and ASIC3 involve in hyperalgesia induced by cisplatin administration in rats. *Pain*. 149(2): 393-405, 2010
- Hattori T et al., ASIC2a and ASIC3 heteromultimerize to form pH-sensitive channels in mouse cardiac dorsal root ganglia neurons. *Circulation Research*. 105(3): 279-86, 2009
- Wang Y et al., Expressions of P2X<sub>2</sub> and P2X<sub>3</sub> receptors in rat nodose neurons after myocardial ischemia injury. *Autonomic Neuroscience*. 145(1-2): 71-5, 2009
- Knowlton et al., TRPM8, but not TRPA1, is required for neural and behavioral responses to acute noxious cold temperatures and cold-mimetics in vivo. *Pain*. 150(2): 340-50, 2010

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 8件)

Takayoshi Ueno, Kazuhira Endo, Kiyomi Hori, Noriyuki Ozaki, Akira Tsuji, Satoru Kondo, Naohiro Wakisaka, Shigeyuki Muro, Kazunori Kataoka, Yasuki Kato, Tomokazu Yoshizaki. Assessment of antitumor activity and acute peripheral neuropathy of 1,2-diaminocyclohexane platinum (II)-incorporating micelles (NC-4016). International Journal of Nanomedicine. 2014; 9: 3005-3012 査読有 DOI 10.2147/IJN.S60564

堀 紀代美, 尾崎紀之. 講座骨格筋の基礎知識 6, 骨格筋の神経制御. 理学療法. 2013; 30(1): 77-83 査読なし

Masaya Yasui, Yosuke Shiraiishi, Noriyuki Ozaki, Koei Hayashi, Kiyomi Hori, Masahito Ichianagi, Yasuo Sugiura. Nerve growth factor and associated nerve sprouting contribute to local mechanical hyperalgesia in a rat model of bone injury. European Journal of Pain. 2012; 16(7): 953-965 査読有 DOI: 10.1002/j.1532-2149.2011.00094.x

堀 紀代美, 尾崎紀之. 講座骨格筋の基礎知識 5, 骨格筋と運動神経. 理学療法. 2012; 29(12): 1404-1410 査読なし

堀 紀代美, 尾崎紀之. 講座骨格筋の基礎知識 4, 骨格筋の微細構造と収縮機構. 理学療法. 2012; 29(11): 1271-1278 査読なし

堀 紀代美, 尾崎紀之. 講座骨格筋の基礎知識 3, 骨格筋の形態と機能. 理学療法. 2012; 29(10): 1158-1164 査読なし

堀 紀代美, 尾崎紀之. 講座骨格筋の基礎知識 2, 筋の発生学. 理学療法. 2012; 29(9): 1040-1045 査読なし

堀 紀代美, 尾崎紀之. 講座骨格筋の基礎知識 1, 骨格筋について学ぶ意義. 理学療法. 2012; 29(8): 911-917 査読なし

[学会発表](計 18件)

堀 紀代美. Involvement of ion channels in cold allodynia in a new rat model of peripheral arterial disease. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会・第92回日本生理学会大会合同大会, 2015/3/21, 神戸国際会議場(神戸市)

Hori K. P2X<sub>3,2/3</sub> and ASICs contribute to

muscle hyperalgesia and intermittent claudication in a new rat model of peripheral arterial disease. The 5th Asian Pain Symposium, 2013/12/18, National Institute for Physiological Sciences (Okazaki)

堀 紀代美. 新たに開発したモデル動物を用いた末梢性動脈疾患に伴う疼痛機序の解明. 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2013/3/30, サポートホール高松・かがわ国際会議場(香川県高松市)

Kiyomi Hori. P2X<sub>3,2/3</sub> and ASICs plays a key role in muscle hyperalgesia and intermittent claudication in a new rat model of peripheral arterial disease. 14th Word Congress On Pain, 2012/8/30, Milano Convention Center (Milan, Italy)

堀紀代美. 新たに開発したモデル動物を用いた末梢動脈疾患に伴う疼痛機序の解明. 第47回日本理学療法学会学術大会, 2012/5/27 神戸ポートピアホテル・神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

[その他]  
ホームページ等  
<http://anatomy-2.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし

(4) 研究協力者  
尾崎 紀之 (OZAKI, Noriyuki)  
金沢大学・医学系・教授

山口 豪 (YAMAGUCHI, Takeshi)  
金沢大学・医学系・助教

白石 昌武 (SHIRAISHI, Yoshitake)  
金沢大学・医学系・技術専門職員

中村 恒夫 (NAKAMURA, Tsuneo)  
金沢大学・医学系・技術専門職員