

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462377

研究課題名(和文)術後痛病態形成における炎症活性化脂質シグナルの役割の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the role of inflammation-activated lipid signaling in incisional 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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：強力な白血球活性化因子ロイコトリエンB4(LTB4)が術後疼痛病態形成にどのように関与するか、LTB4受容体(BLT1)遺伝子欠損マウスと足底切開による術後痛モデルを用い研究を行った。機械的刺激による痛覚反応は、術後2日目、3日目、4日目にBLT1欠損マウスで有意に減弱し、切開部位の好中球浸潤とサイトカイン含量も、術後1日目に有意に低下した。組織損傷時に産生されるLTB4が受容体BLT1を介して好中球浸潤とサイトカイン産生を引き起こし、術後疼痛の要因の一つとなっていることが分かった。

研究成果の概要(英文)：We studied the involvement of Leukotriene B4 (LTB4) which is a potent neutrophil activator, in acute incisional pain model using high affinity LTB4 receptor (BLT1) deficiency mice. Mechanical nociceptive responses were reduced significantly on day2, day3 and day4 after incision in BLT1 deficiency mice compare to the wild type mice. Invasions of neutrophil were reduced significantly on day1 in BLT1 deficiency mice. Productions of TNF-alpha in incisional site were also reduced significantly on day1 in BLT1 deficiency mice. It was found that LTB4 that is produced as a lipid mediator at local site, induce the neutrophil invasion and cytokine production through its receptor BLT1 and contribute to acute incisional pain response.

研究分野：医歯薬学

キーワード：脂質 疼痛学 術後痛

1. 研究開始当初の背景

組織傷害により末梢の神経損傷が生じると、損傷部位では様々なメディエーターにより、侵害受容器が活性化され、その結果痛覚伝達の最初の中継地である脊髄で神経細胞の感受性が増大し、痛覚過敏を引き起こす。また損傷部位では白血球が活性化され炎症が誘発される。白血球より遊離したロイコトリエン、サイトカイン、ケモカインの働きでさらに白血球が血管内から遊走し、遊走した好中球やマクロファージより放出されるリゾチーム酵素や活性酸素が神経系にもなんらかの作用を起こし、痛覚過敏の要因の一つになっていることが考えられる。強力な白血球活性化因子ロイコトリエン B4 (LTB4) の高親和性受容体 (BLT1) を介した損傷部位での作用が、炎症反応とそれに続く痛覚過敏状態にどのように関与しているのか、解明を試みた。研究代表者等の以前の研究により、急性痛モデルであるホルマリンテストにおける疼痛反応が、BLT1 欠損マウスにて有意に減弱していることが、すでに報告されている。また、BLT1 遺伝子欠損マウスの後根神経節における侵害受容器 (TRPV1 陽性細胞、CGRP 陽性細胞) の発現は、野生型マウスと差がないことも研究代表者らの先行研究で確認されている。

2. 研究の目的

強力な白血球活性化因子ロイコトリエン B4 (LTB4) が術後痛の病態形成にどのように関与するか解明する。組織損傷時に、ホスホリパーゼ A2 (PLA2) を初発酵素として産生される脂質メディエーターによる炎症細胞活性化が、神経系の脊髄レベル、末梢レベルでどのような変化をもたらすかを解明し、それらを適切な時期に抑制することにより、術後疼痛病態の増悪を阻止し、効果的な治療法を開発することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

LTB4 受容体 1 (BLT1) 欠損マウスで術後痛モデルを作成し野生型マウスとの比較により、生理活性脂質による炎症細胞活性化と痛覚にかかわる神経系分子の時間的空間的变化を解析する。

10~14 週齢の雄性マウスを用いた。

a) 術後痛モデルの作成 (Pogatzki, Brennan によるモデル)

イソフルレン麻酔下にて、マウス右足底の皮膚筋膜を切開し、筋肉剥離後皮膚を閉じる術後痛モデルを作製する。これにより著明な痛覚過敏とアロディニアが誘起される。

b) 行動学的解析 (手術前、手術後 2 時間、1 日、2 日、3 日、4 日、7 日、14 日)

von Frey テスト—機械的刺激による疼痛反応マウスを網の上に置き、環境への馴化の後、

様々な重さの von Frey フィラメントを足底にあて触圧刺激を加え、足を挙げる逃避反応を示すフィラメントの重さより反応を起こす 50% 閾値を測定する。痛覚過敏状態では、通常では逃避反応を示さない細いフィラメントで逃避反応を示すようになる。

c) 炎症性細胞の影響

好中球や単球浸潤については、足底組織を各時間経過 (術前、術後痛モデル 3 時間後、1 日、2 日、7 日) で採取し、組織酵素処理による細胞分離後、フローサイトメーターを用いて細胞分画の解析を行った。CD11b 陽性・Gr-1 強陽性の細胞集団を好中球、CD11b 陽性・Ly-6C 強陽性の細胞集団をマクロファージ (炎症性単球) として解析した。

d) 局所サイトカインの定量

足底組織を各時間経過 (術前、術後痛モデル 3 時間後、1 日、3 日、7 日) で採取し、プロテアーゼインヒビターを添加したリン酸バッファーを用いてホモゲナイズ後遠心処理した上清を作成する。上清のタンパク濃度測定後、各サイトカイン特異的な抗体がコーティングされた蛍光ビーズと反応させ、遠心洗浄後、フローサイトメーターにて局所サイトカインを測定 (CBA: Cytometric Beads Array) し、標準サイトカイン測定による検量線から、各サイトカイン含量を計算し比較した。

4. 研究成果

1) 術後痛モデル疼痛行動の解析

von frey test : ipsilateral

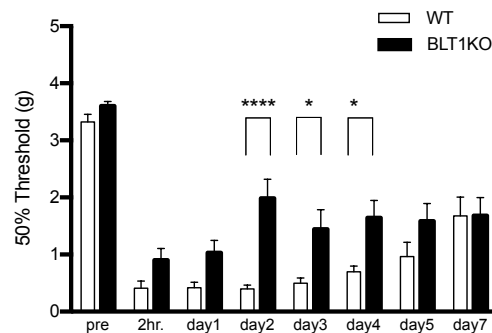


図 1 : 機械的刺激に対する疼痛反応閾値

術後痛モデルにて機械的刺激に対する切開側 (ipsilateral) の疼痛反応は 2 日目、3 日目、4 日目に BLT1 受容体欠損マウスで有意に減弱していた。非切開側 (contralateral) では差が認められなかった。

(* p<0.05, **** p<0.0001 vs. WT Two-way ANOVA and Bonferroni post hoc test)

BLT1 受容体を介するシグナル伝達が、術後 4 日目までの急性期の術後疼痛に関与していることが示唆された。

そこで、LTB4-BLT1 シグナルを介する病態

の主体となる、切開部位における炎症細胞浸潤について、フローサイトメーターを用いて詳細に解析した。

2) 局所炎症性細胞の影響

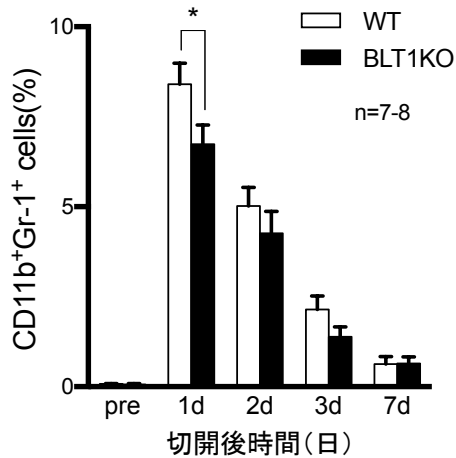


図2 切開局所における好中球浸潤

好中球分画は両群ともに術後1日をピークとして漸減した。切開1日後は野生型マウス群に比べてBLT1欠損マウス群において有意に低値だった(* $p < 0.05$ vs. WT, $n = 7-8$, Two-way ANOVA and Bonferroni post hoc test)。切開2・3日後においても、WT群に比べて減少傾向が認められた。

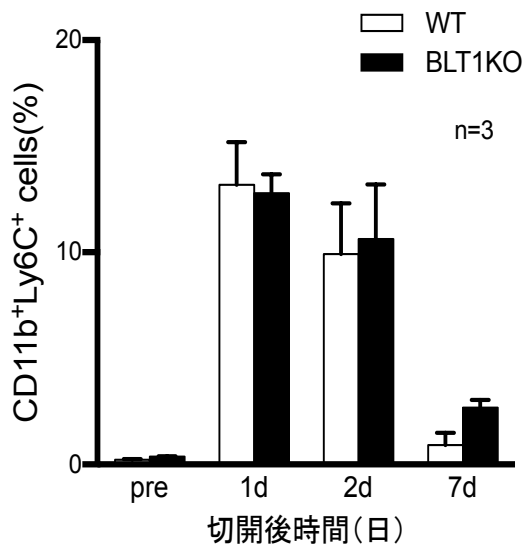


図3 切開局所における炎症性単球浸潤

マクロファージ(炎症性単球)浸潤についてはBLT1欠損マウス群、野生型マウス群ともに術後1日がピークとなる局所浸潤が認められたが、両群に差はなかった。この結果は、好中球遊走や好中球ミエロペルオキシダーゼリリースといった好中球活性化にLTB4-BLT1シグナルが強く関与している過去の報告を裏付ける結果である。切開1日

目に認められる組織障害部位での好中球浸潤の低下が疼痛反応にどのように影響しているかについては、今後検討を要する。

マクロファージ(炎症性単球)浸潤については、同様週令サイズのBLT1受容体欠損マウスを得ることができず、少数での比較となっており、より数を増やした解析が今後必要である。

2) 局所サイトカインの定量: CBA

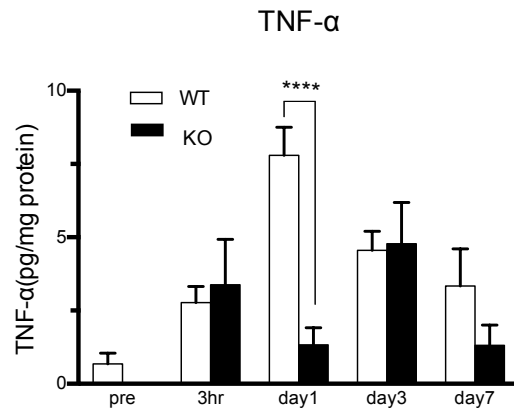


図4 切開局所におけるTNF- α 含量
切開1日目において野生型マウス群に比べてBLT1欠損マウス群において有意に低値だった(**** $p < 0.0001$ vs. WT, $n = 7-8$, Two-way ANOVA and Bonferroni post hoc test)。

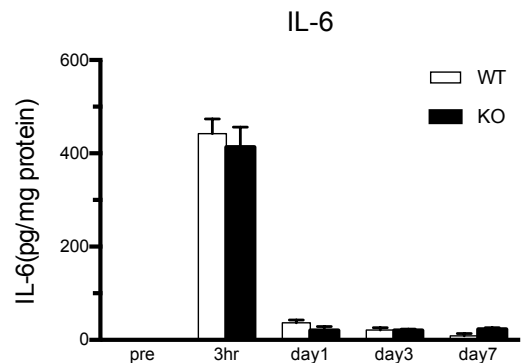


図5 切開局所におけるIL-6含量
BLT1欠損マウス群、野生型マウス群ともに切開3時間後にピークとなる局所IL-6含量の増加が認められたが、両群に差はなかった。

この結果から、LTB4-BLT1受容体シグナルが局所での好中球活性化とTNF- α 産生を増大させ、急性期の機械的刺激による痛覚過敏を引き起こしていることが分かった。

今後、局所でのLTB4産生の確認や、末梢神経レベル、脊髄レベルでのBLT1受容体の役割やLTB4産生の可能性、受容体阻害剤の効果についてさらに探求していきたい。

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)

① Miho Asahara, Nobuko Ito, Takehiko Yokomizo, Motonao Nakamura, Takao Shimizu, Yoshitsugu Yamada The absence of the leukotriene B4 receptor BLT1 attenuates peripheral inflammation and spinal nociceptive processing following intraplantar formalin injury Molecular Pain 査読あり 10.1186/s12990-015-0010-9 2015

[学会発表] (計 7 件)

① 浅原美保、伊藤伸子
ロイコトリエン B4 受容体 BLT1 抑制による急性痛減弱機序の検討-ホルマリンテストを用いて 第36回日本疼痛学会 2014年6月20日 KKR ホテル大阪 (大阪府・大阪)

② Miho Asahara, Nobuko Ito, Takehiko Yokomizo, Motonao Nakamura, Takao Shimizu, Yoshitsugu Yamada
Reduced local inflammation affected the attenuation of pain behavior following formalin injection in BLT1 deficiency mice 15th World congress pain 2014年10月18日 Buenos Aires, Argentina

③ 浅原美保、横島弥栄子、伊藤伸子、戸津ときえ、山田芳嗣
実験的白血球減少がホルマリンテストの疼痛行動に与える影響 第62回日本麻酔科学会 2015年5月29日 神戸ポートピアホテル (兵庫県・神戸)

④ 浅原美保、横島弥栄子、伊藤伸子
急性痛における LTB4-BLT1 シグナリングの末梢炎症反応と脊髄後角 ERK 活性化に及ぼす役割 第37回日本疼痛学会 2015年7月3日 熊本市民会館 (熊本県・熊本)

⑤ Miho Asahara, Nobuko Ito, Takehiko Yokomizo, Motonao Nakamura, Takao Shimizu, Yoshitsugu Yamada
The absence of the Leukotriene B4 receptor BLT1 attenuates peripheral inflammation and spinal nociceptive processing following intraplantar formalin injury 14th International Bioactive Lipids Conference 2015年7月14日 Budapest, Hungary

⑥ 浅原美保、横島弥栄子、伊藤伸子、戸津ときえ、山田芳嗣
マウス術後痛モデルにおける LTB4-BLT1 シグナリングの役割 第63回日本麻酔科学会 2016年5月27日 福岡サンパレス (福岡県・福岡)

⑦ Miho Asahara, Nobuko Ito, Takehiko Yokomizo, Motonao Nakamura, Takao Shimizu, Yoshitsugu Yamada

Reduced local recruitment of neutrons affected the attenuation of pain behavior following hind paw incision in BLT1 deficiency mice 16th World congress pain 2016年9月27日 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜)

[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
浅原 美保 (ASAHARA, Miho)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60529155

山田 芳嗣 (YAMADA, Yoshitsugu)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：30166748

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：

(4) 研究協力者 ()