

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 24 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462383

研究課題名(和文)術後痛と創傷治癒におけるTRPA1チャネルの役割

研究課題名(英文)The role of TRPA1 in postoperative pain and wound healing

研究代表者

長谷川 麻衣子 (Hasegawa, Maiko)

鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授

研究者番号：20516637

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)：炎症と術後急性期の痛みの修飾機構の関連を、TRPA1欠損マウスをもちいて検討した。マウスの足底に切開創を作成し疼痛閾値、好中球の浸潤、マクロファージの極性を検討した。TRPA1欠損マウスでは、機械的刺激に対する疼痛閾値に有意差は認められなかった。しかし手術部位の好中球数はTRPA1欠損マウスで減少を認めた。M1マクロファージが術後2日目に減少しており、炎症後期に創傷治癒を促進するM2マクロファージも術後7日目に低下していた。TRPA1欠損マウスでは、TNF- $\alpha$  やCOX-2の産生が術後7日目に増加していることが判明した。術後痛と炎症性物質の産生量は術後後期には必ずしも一致しないことが判明した。

研究成果の概要(英文)：The correlation between inflammation and acute postoperative pain was investigated using TRPA1<sup>-/-</sup> mice. In TRPA1<sup>-/-</sup> mice, mechanical threshold was not altered at the sites of incision. However, the number of neutrophils and M1 macrophages was significantly decreased on POD2. Similarly, M2 macrophages was decreased on POD7, whereas the production of TNF- $\alpha$  and COX-2 was increased. In late phase of postoperative period, pain intensity may not be consistent with the production of pro-inflammatory mediators.

研究分野：麻酔科学

キーワード：TRPA1 術後痛 創傷治癒 急性炎症

## 1. 研究開始当初の背景

遷延性術後痛は術後3ヶ月以上経過したのちにも創部痛が続く状態であり、10-50%の手術患者において発症することが報告されている。

その原因としては

- (1) 術前因子: 術前の疼痛の強さ、慢性炎症性疾患の合併
- (2) 術中因子: 術式(神経損傷、リンパ節廓清)、麻酔関連薬、麻酔法
- (3) 術後因子: 急性痛のコントロール不良、オピオイド使用量の増加

などが挙げられる。

術後急性期には好中球やマクロファージ等の炎症細胞が浸潤し、壊死細胞や微生物の排除を促進するために、TNF やPGE1 といった炎症性物質を産生する。これらは、疼痛増強物質としても作用するため、炎症を制御することが急性痛を制御することにもつながる。

炎症期が適切に経過すると細胞増殖、血管新生が促進され創傷治癒期へと移行する。その制御因子として機能しているのがマクロファージである。

マクロファージは、炎症から創傷治癒に移行する過程においてM1型からM2型へ極性変化することにより、炎症の終結と組織のリモデリングを制御している。研究代表者は、術後痛モデルにおいてM1からM2マクロファージへの極性変化を誘導することにより、炎症性疼痛の遷延化を抑制すること、機序として低酸素によって誘導されるheme oxygenase-1(HO-1)がM2マクロファージの分化を促進し、インヒビター(SnPP)の投与により疼痛が増強することを報告している(PAIN 2013 154:1402-12)。しかし、M1型からM2型への移行が生理的にどのように制御されているのか、また術後急性期に遷延痛の病態を形成するメカニズムは明らかになっていない。

一方、TRPA1はTRPチャネルのひとつであり、感覚神経の神経終末において活性酸素種を含む炎症関連物質や外因性侵害物質を感知し、疼痛などの生体防御反応を誘起させる。研究分担者である桑木は、低酸素下においてプロリン水酸化酵素の活性化と低酸素状態における生体応答の制御に最も重要な転写因子、HIF-1の活性化を介してTRPA1の発現が上昇し、感覚神経を興奮させることを明らかにした。

また、TRPA1は炎症のイニシエーターとしての機能を有しているが、炎症の終結にも重要であることが示唆されている。膝炎モデルにおいてTRPA1アゴニストの早期投与により神経原性炎症を抑制し、急性痛から慢性痛への移行を抑制することが明らかになっている。そのため、TRPA1チャネルは疼痛のみでなく、マクロファージの極性変化や炎症から炎症の終結、創傷治癒期への移行に関与し、急性痛から遷延痛への移行とも関連性があるものと考え研究をおこなった。

## 2. 研究の目的

本研究は術後急性期における遷延性術後痛の発症機転を解析し、周術期に施行可能な予防方法を検索することが目的である。

創傷部位において、TRPA1は侵害受容器が活性化され疼痛がおけると同時に、神経原性炎症を促進し、免疫細胞の浸潤による炎症の増悪や虚血性変化の進行を修飾している。このような一連の急性期反応の長期化が遷延性術後痛の発症に深く関与していると考え、TRPA1欠損マウスを用いて、以下に焦点をあて解析をおこなった。

- (1) 低酸素応答に最も重要である転写因子HIF-1 $\alpha$ はマクロファージのM1誘導に深く関与していることが報告されており、低酸素と疼痛の因果関係を明らかにした。また低酸素によって誘導され、酸化ストレス反応を調節するheme oxygenase (HO)-1の誘導も検討した。
- (2) 低酸素によるTRPA1の活性化と(1)の誘導から、TRPA1によるマクロファージ極性の修飾を検証した。
- (3) M1マクロファージによる壊死細胞の排除やM2マクロファージの誘導により、創傷治癒期に移行する。TRPA1が急性期炎症反応のみでなく、創傷治癒へ影響する可能性を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) TRPA1の術後痛への寄与の検討

術後手術部位組織の酸素濃度やpHの低下が、術後痛の程度と相関することは報告されている(Anesthesiology 2004 101:468-475)。術後痛と酸素センサーであるTRPA1活性化の因果関係を明らかにするため、TRPA1欠損マウスにおいて、1%イソフルラン吸入下に切開創を作成し、手術から術後7日目のvon Freyによる機械的刺激、熱刺激(Hargreaves)に対する疼痛反応を評価した。

### (2) 好中球浸潤とマクロファージ極性の比較検討

TRPA1欠損マウスにおける好中球数、M1/M2バランスをGr-1<sup>+</sup>好中球、M1マクロファージ(F4/80<sup>+</sup>/iNOS<sup>+</sup>)、M2マクロファージ(F4/80<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup>)の免疫染色により炎症期(day 2)と創傷治癒期(day 7)において比較した。

### (3) TRPA1による炎症性物質産生の制御

低酸素性転写因子HIF-1 $\alpha$ やheme oxygenase-1の誘導をリアルタイムPCRにより定量化し、マクロファージ極性への影響を検討した。M1産生性疼痛促進物質(iNOS, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ )やM2産生性抗炎症サイトカイン(IL-10)の発現量を、術後2日目、7日目においてリアルタイムPCRによって定量化した。

### (4) 創傷治癒の評価

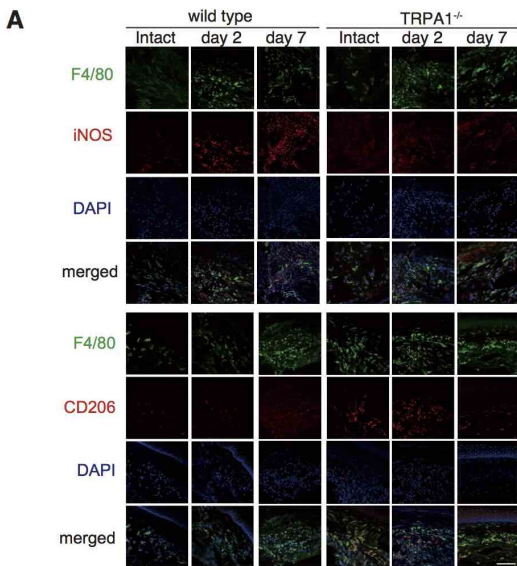
創傷治癒の過程において炎症期を経て増殖期に移行すると、線維芽細胞の増殖とともにコラーゲンの産生が増加する。Masson Trichrome染色によりコラーゲンの産生量を野生型マウスとTRPA1欠損マウスにおいて比較検討した。またELISAとリアルタイムPCRによりコラーゲン産生量を評価した。

#### 4. 研究成果

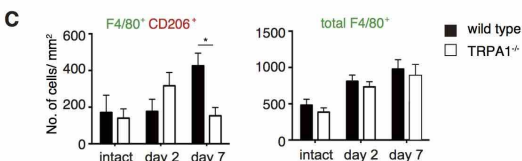
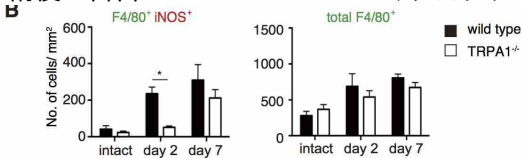
von Frey test によって評価した機械的刺激に対する疼痛閾値は、野生型マウスと TRPA1 欠損マウスで術後 7 日目まで有意差はみとめなかった。

手術部位の Gr-1<sup>+</sup>好中球は、術後 1 日目に TRPA1 欠損マウスにおいて減少しており(図 A, B)、一致して好中球の活性化に関し疼痛増強物質である IL-1 $\beta$ の産生も術後 1 日目に有意に低下していた(図 C)。

M1 マクロファージは壊死細胞や微生物を貪食、殺菌し、アポトーシスにむかう好中球を貪食することにより M2 マクロファージに極性変化することが知られている。



術後 2 日目の F4/80<sup>+</sup>/iNOS<sup>+</sup>M1 マクロファ-



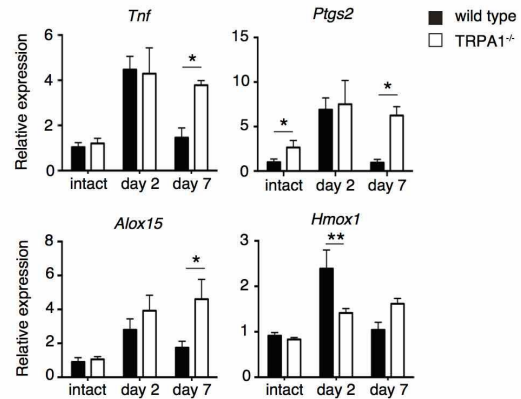
ジ数は TRPA1 欠損マウスで著明に減少していたが、術後 7 日目には野生型マウスと差をみとめなかった(図 A, B)。一方、F4/80<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup>M2 マクロファージ数は術後 7 日目に TRPA1 欠損マウスで有意に減少していた(図 A, C)。総マクロファージ数は術後 2 日目と 7 日目で両群に差はなかった(図 A, B, C)。

以上から、自然免疫の最前線で異物除去をおこなう好中球の recruitment に TRPA1 の活性化が関与していることが示唆され、好中球の減少が M1/M2 バランスに影響しているものと考えられた。また、総マクロファージ数は差をみとめなかったことから、マクロファージの浸潤には TRPA1 は関与しておらず、極性変化に影響があることが示唆された。同様に、TRPA1 欠損マウスにおける術後 2 日目

の F4/80<sup>+</sup>/iNOS<sup>+</sup>M1 マクロファージの減少、術後 7 日目の F4/80<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup>M2 マクロファージ数の減少と疼痛行動が一致しなかった。

継続的な炎症活性状態を検討するため、炎症によって誘導されるサイトカインや酵素の定量をおこなった(下図)。

まず低酸素で誘導され、組織保護作用を有し、M1 から M2 マクロファージの極性変化



を促進する HO-1 の誘導が術後 2 日目に TRPA1 欠損マウスにおいて低下を示した。術後 2 日目の TNF の誘導には差はなかったが、TRPA1 欠損マウスでは、術後 7 日目においても術後 2 日目と同等の発現量を認めた。同じく M1 から M2 型への極性変化を誘導する COX-2 (*Ptgs2*) の発現は手術前から TRPA1 欠損マウスで高く、術後 7 日目に野生型マウスと比較して、活性が持続していることが示唆された。また M2 マクロファージ優位に発現する 15-LO(*Alox15*)は、TRPA1 欠損マウスで術後 7 日目に上昇していることが判明した。HIF-1、IL-10、iNOS に関しては検証中である。

疼痛増強物質である TNF や、PGE<sub>2</sub> や PGE<sub>2</sub> の産生を誘導する COX-2 が術後 7 日目の TRPA1 欠損マウスにおいて有意に高値を示したにもかかわらず、機械的刺激に対する疼痛閾値に差を認めなかった。TRPA1 欠損マウスでは COX-2 と 15-LO 双方の誘導が亢進しており、TRPA1 欠損マウスではアラキドン酸代謝全体が炎症後期においても活性化状態を維持する可能性が考えられた。

術後 7 日目の創傷治癒を Masson Trichrome 染色によりしたが、切開部位からの距離によって、かなり線維芽細胞や collagen の局在が異なり、定量評価方法を今後も検討する必要があると考えられる。Collagen II の発現量は、術後 7 日目の TRPA1 欠損マウスで有意な増加を示した。

TRPA1 欠損マウスにおいて、創傷治癒期における M2 マクロファージの有意な減少を認めたものの、実際に創傷治癒遅延がおこっているのか今後も検証する予定である。また疼痛と炎症性物質の産生やマクロファージ極性が一致しないことから、炎症細胞を介さない機序があるものと示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

英文雑誌

1. Yamada T, Hasegawa-Moriyama M, Kurimoto T, Saito T, Kuwaki T, Kanmura Y. Peripheral Nerve Block Facilitates Acute Inflammatory Responses Induced by Surgical Incision in Mice. Reg Anesth Pain Med. 2016;41:593-600. (査読有)

2. Ohnou T, Yokai M, Kurihara T, Hasegawa-Moriyama M, Shimizu T, Inoue K, Kambe Y, Kanmura Y, Miyata A. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type 1 receptor signaling evokes long-lasting nociceptive behaviors through the activation of spinal astrocytes in mice. J Pharmacol Sci. 2016 Apr;130(4):194-203. (査読有)

3. Saito T, Hasegawa-Moriyama M, Kurimoto T, Yamada T, Inada E, Kanmura Y. Resolution of Inflammation by Resolvin D1 Is Essential for Peroxisome Proliferator-activated Receptor- $\alpha$ -mediated Analgesia during Postincisional Pain Development in Type 2 Diabetes. Anesthesiology 2015;123:1420-34 (査読有)

4. Godai K, Hasegawa-Moriyama M, Kurimoto T, Saito T, Yamada T, Sato T, Kojima M, Kanmura Y. Peripheral administration of morphine attenuates postincisional pain by regulating macrophage polarization through COX-2 dependent pathway. Mol Pain 2014;10:36. (査読有)

和文雑誌

長谷川麻衣子 炎症とは：炎症の機序と痛み  
ペインクリニック2016;37:1497-1504. (総説、  
査読なし)

〔学会発表〕(計 5 件)

長谷川麻衣子 日本臨床麻酔学会第 36 回大会, 2016 年 11 月 (ザ クラウンパレス新阪急高知、高知県高知市) 術後痛と手術部位感染・創傷治癒, シンポジウム

長谷川麻衣子 日本臨床麻酔学会第 36 回大会, 2016 年 11 月, (ザ クラウンパレス新阪急高知、高知県高知市) 手術部位感染と術後痛－炎症は抑えていいのか? シンポジウム

長谷川麻衣子 日本ペインクリニック学会第 50 回大会, 国内会議, 2016 年 07 月, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市), 炎症性疼痛に用いる鎮痛薬; 炎症は抑えたほうがよいのか? シンポジウム

Yamada T, Hasegawa-Moriyama M, Kurimoto T, Saito T, Kanmura Y. Peripheral nerve block with ropivacaine accelerates acute

inflammation wound healing process in incised tissue of mice. Anesthesiology 2015, 国際会議, 2015 年 10 月, San Diego, USA, ポスター

山田知嗣、長谷川麻衣子、齋藤貴幸、五代幸平、上村裕一 ロピバカインを用いた神経ブロックは、局所浸潤麻酔と比較してマクロファージを介した創傷治癒を促進する。日本ペインクリニック学会第 48 回大会, 2014 年 07 月, 京王プラザホテル(東京都 新宿区), ポスター

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~ana-ccm/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川麻衣子 (HASEGAWA, Maiko)  
鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授  
研究者番号: 20516637

(2) 研究分担者

桑木 共之 (KUWAKI, Tomoyuki)  
鹿児島大学・医歯学域医学系・教授  
研究者番号: 80205260

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし