

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07819

研究課題名(和文)慢性虚血性疼痛における血管内皮増殖因子のスプライスバリエーションの関与について

研究課題名(英文) Altering VEGF-A165a/VEGF-A165b balance contribute to muscle hyperalgesia in a 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(PAD)に伴う虚血性の筋痛のメカニズムを解析するため、我々が開発したPADモデルを用いて、虚血性疼痛における血管内皮増殖因子(VEGF)のスプライスバリエーションVEGF165aとVEGF165bの関与を検討した。ラットの左下肢への血流を阻害することにより慢性の腓腹筋の圧痛が認められた。この筋痛はSPARK阻害剤によるVEGF165a生成の阻害により抑制され、中和抗体によるVEGF165bの阻害で増悪した。PADの虚血性筋痛にはVEGF165aとVEGF165bの発現バランスが重要であると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

末梢動脈疾患(PAD)では、手足の冷感や、歩行時や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、大きな問題となっている。ADは急速な社会の高齢化に加え、食生活の欧米化、などに伴い増加しており、高齢者に高い疾患頻度が報告されているが、四肢末梢における虚血性疼痛の機序はほとんど研究が進んでおらず、経過観察および対症療法でしか対応できていない。本研究により、虚血性の筋痛とVEGFの2つのスプライスバリエーションの発現バランスとの関与が明らかになり、さらなるメカニズムの解明は必要ではあるが、除痛法の開発につながることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：AIM: To demonstrate neuronal mechanisms underlying ischemic pain with PAD, we investigated the role of altering VEGF-A165a/VEGF-A165b balance on muscle hyperalgesia in a rat model of PAD. METHODS: We ligated the left common iliac and iliolumbar arteries completely. Expression of pan-VEGF-A and VEGF-A165b was examined in DRG neurons innervating GM by immunohistochemistry. Effects of VEGF-A165b neutralizing antibody (VEGF-A165b Neu-Ab) were evaluated on behavioral responses. Effects of a SRPK-1/2 inhibitor on behavioral responses were also examined. RESULT: We found muscle hyperalgesia after ligation. Expression of VEGF-A165b in DRG neurons innervating GM decreased in PAD rats. Intramuscular injection of SRPIN340 suppressed muscle hyperalgesia. Although intramuscular injection of VEGF-A165b Neu-Ab make it worse in PAD rats. CONCLUSION: The relative levels of altering VEGF-A165a/VEGF-A165b are critical for developing muscle hyperalgesia associated with PAD.

研究分野：神経科学

キーワード：虚血性疼痛 VEGF-A165a VEGF-A165b 末梢動脈疾患 筋痛 痛覚過敏 血管内皮増殖因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

組織の虚血は疼痛をもたらし、四肢の末梢領域において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。世界の成人の約6%の人がPADに罹患しておりその有病率は増加の一途をたどっており、多くの患者が虚血性の脚の痛み悩まされているが、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(Golledge, 2022)。

PAD患者の下肢筋で、血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor A: VEGF-A)の発現の増加が報告されている。VEGF-Aは組織低酸素により誘導され、組織の血管新生、神経の保護および侵害受容に関与することが知られている。VEGF-AにはVEGF遺伝子の8番目のエクソン末端のスプライシングの違いによって、VEGF-A_{165a}とVEGF-A_{165b}という2つのスプライスバリエーションの存在が同定されている(165はアミノ酸の数)。VEGF-A_{165a}は侵害受容性を、VEGF-A_{165b}は抗侵害受容性を示し、Hulseらは、“痛みを促進する”VEGF-A_{165a}と“痛みを阻害する”VEGF-A_{165b}の量的バランスが神経因性疼痛の発現に重要であると報告した(Hulse et al., 2014)が、虚血性疼痛においてVEGF-A_{165a}とVEGF-A_{165b}の発現量やそのバランス、および疼痛における侵害受容性のVEGF-A_{165a}の関与については明らかでない。

我々はPADの虚血性疼痛のメカニズムを明らかにするためモデル動物の開発に取り組み、総腸骨動脈および腸腰動脈を結紮することにより下肢の血流を阻害したラットでは慢性的な筋の痛覚過敏が認められ、また間歇性跛行が数ヶ月持続することを確認し、さらに冷刺激に対しても痛覚過敏が見られる、臨床に近い慢性的な虚血性筋痛を伴うPADのモデルラットの開発に成功した。さらに、申請者はこのモデル動物を用いて、PADの痛覚過敏には、痛み受容器への刺激を電気信号に変換するイオンチャネルであるP2X_{3,2/3}、ASIC3およびTRPA1が関与し、これらの活性化による一次知覚神経の興奮性の亢進が虚血性疼痛を引き起こすことを明らかにした。さらに、虚血筋では神経成長因子(Nerve growth factor: NGF)の発現が増加し、この増加したNGFがASIC3の発現増加に関与することを明らかにした(Hori et al., 2018)。しかしながらNGFだけでは末梢感作の全貌が説明できず、他にも大きく関与する因子の存在が示唆される。そこで申請者は、PADにおいて、抗侵害受容性のVEGF-A_{165b}に対し侵害受容性のVEGF-A_{165a}が増加するという、両者の量的バランスの変化が虚血性疼痛の発現に重要なのではないかとまた増加した侵害受容性のVEGF-A_{165a}がPADモデルのイオンチャネルの活性化に関与すると考えた。

2. 研究の目的

本研究では我々が開発した動物モデルを用いて、下肢の虚血に起因する痛覚過敏に対するVEGF-AのスプライスバリエーションVEGF-A_{165a}およびVEGF-A_{165b}の関与について検討する。さらに、VEGF-A_{165a}とVEGF-A_{165b}のバランスの破綻がイオンチャネルの活性化を引き起こすという末梢感作のメカニズムを明らかにする。これらにより、PADに伴う虚血性疼痛の効果的な治療法の開発につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) PADモデルラットの作成

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。対照群では動脈の露出のみ行う。このPADモデルラットでは、動脈結紮後より皮膚の痛覚過敏が7日間、筋の痛覚過敏が21日間認められ、間歇性跛行が数ヶ月持続し、さらに冷痛覚過敏が7日目から14日目まで認められることを確認している(図1)。

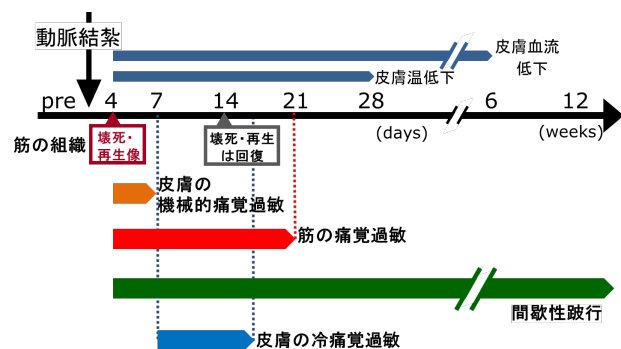


図1 下肢虚血(PADモデル)ラットの痛覚閾値の変化のまとめ

(2) PADモデル動物における、VEGF-A_{165a}およびVEGF-A_{165b}の虚血下肢および知覚神経での発現量

PADモデルの虚血下肢の筋組織内のVEGF-A_{165a}およびVEGF-A_{165b}の産生を確認するため、PADラットの腓腹筋のVEGF-AおよびVEGF-A_{165b}のタンパクの発現をそれぞれELISA法により測定する。また、知覚神経における発現量についてはDRGにおけるVEGF-AおよびVEGF-A_{165b}の免疫染色により調べる。筋の知覚神経におけるVEGF-AおよびVEGF-A_{165b}の発現を調べるために、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VEGF-AおよびVEGF-A_{165b}の共陽性細胞を検索する。

(3) 虚血性疼痛におけるVEGF-A_{165a}およびVEGF-A_{165b}の関与に対する行動薬理学評価

VEGF-A_{165a}およびVEGF-A_{165b}が虚血性疼痛に関与するか調べるため、虚血によって筋の痛

覚が亢進したモデル動物 (day14) に VEGF-A_{165b} の中和抗体および VEGF-A_{165b} のリコンビナントタンパクをそれぞれ腓腹筋に投与して、疼痛行動の変化を行動薬理的に調べる。また VEGF-A_{165a} については、特異的な抗体が市販されていないため、VEGF-A_{165a} の合成を促進するプロテインキナーゼ SRPK1 の働きを抑制する SRPK 阻害剤 (SRPIN340) を使用して VEGF-A_{165a} の産生を阻害したときの疼痛行動の変化を調べる。

(4) 虚血性疼痛における VEGF-A 受容体型チロシンキナーゼ VEGFR1、VEGFR2 および VEGF-A の共受容体 NRP1、NRP2 の関与に対する行動薬理学評価

PAD の虚血性疼痛に VEGF-A 受容体型チロシンキナーゼ VEGFR1、VEGFR2 および VEGF-A の共受容体 NRP1、NRP2 が関与するか調べるため、VEGFR1、VEGFR2 および NRP1、NRP2 の中和抗体をそれぞれ腓腹筋に投与して、疼痛行動の変化を行動薬理的に調べる。

4. 研究成果

(1) PAD モデル動物における、VEGF-A_{165a} および VEGF-A_{165b} の虚血下肢および知覚神経での発現量

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 14 日目の腓腹筋の ELISA より、虚血肢の腓腹筋の VEGF-A および VEGF-A_{165b} 量は変化を認めなかった。

14 日目の DRG の免疫組織学的評価より PAD モデルの DRG 全体の VEGF-A および VEGF-A_{165b} の発現数はともに変化は認めなかった。腓腹筋由来の知覚ニューロンにおいては VEGF-A は変化を認めなかったものの VEGF-A_{165b} は発現量が減少した。これにより腓腹筋由来の知覚ニューロンで VEGF-A_{165a} の発現量は増加していることが示唆された。

(2) 虚血性疼痛における VEGF-A_{165a} および VEGF-A_{165b} の関与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 14 日目の行動薬理学評価より、筋の痛覚過敏に対し、SRPK 阻害剤および VEGF-A_{165b} のリコンビナントタンパクの投与は PAD モデルの筋の痛覚過敏を抑制した (図 2)。VEGF-A_{165b} の中和抗体の投与は、PAD ラットの筋の痛覚過敏を悪化させ、血管を結紮しない対照群に筋の痛覚過敏を引き起こした (図 3)。

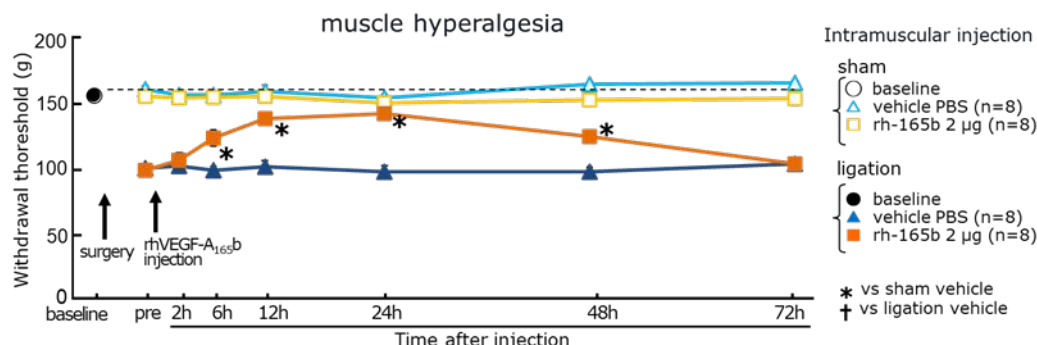


図2 rhVEGF-A_{165b}に対する行動薬理的評価

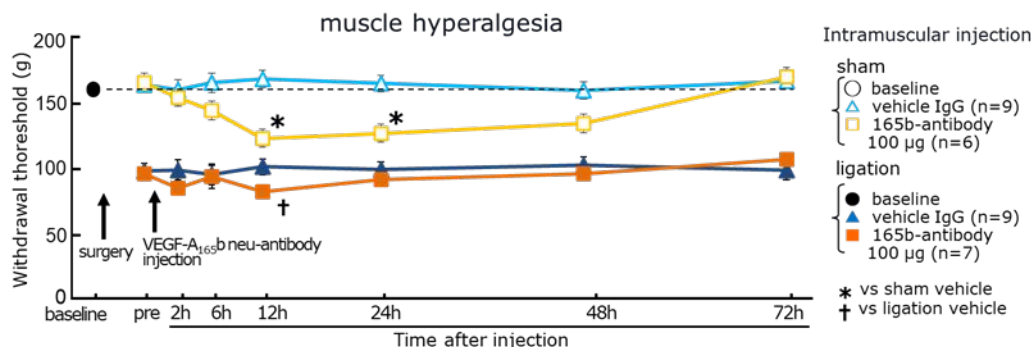


図3 VEGF-A_{165b}中和抗体に対する行動薬理的評価

(3) 虚血性疼痛における VEGF-A 受容体型チロシンキナーゼ VEGFR1、VEGFR2 および VEGF-A の共受容体 NRP1、NRP2 の関与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 14 日目において、VEGF-A 受容体の行動薬理学評価を行った。その結果、VEGFR1 中和抗体の投与は PAD モデルの筋の痛覚過敏を抑制した。しかしながら、VEGFR2 の中和抗体の投与は、PAD ラットの筋の痛覚過敏を悪化させ、血管を結紮しな

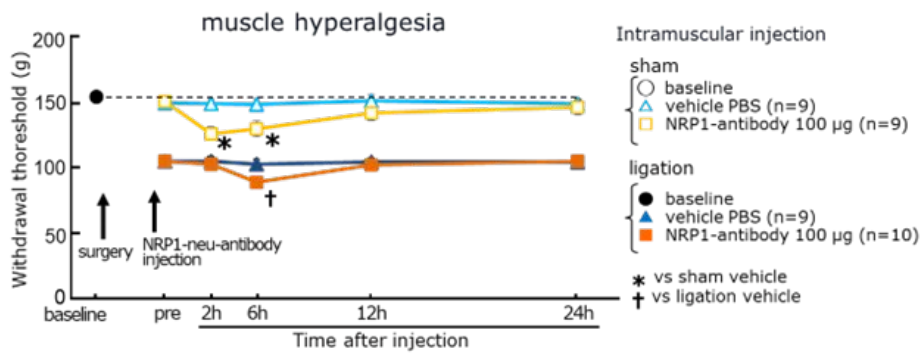


図4 NRP1に対する行動薬理学的評価

い対照群に筋の痛覚過敏を引き起こした（図4）。VEGF-Aの共受容体NRP1の中和抗体の投与はPADラットの筋の痛覚過敏を悪化させ、血管を結紮しない対照群に筋の痛覚過敏を引き起こしたが、NRP2の中和抗体はPAD、対照群ともに痛覚に影響を示さなかった。

以上の実験結果から、下肢の血流阻害による筋の痛覚過敏にはVEGF-A_{165a}とVEGF-A_{165b}の量的バランスの関与が示唆された。また、PADの虚血性の筋の痛覚過敏にはVEGF-A_{165a}-VEGFR1シグナルの関与が示唆され、筋の痛覚過敏の発現に重要と思われた。

<引用文献>

- Golledge J. Update on the pathophysiology and medical treatment of peripheral artery disease. *Nat Rev Cardiol* 19(7): 456-474, 2022
- Hulse et al. Regulation of alternative VEGF-A mRNA splicing is a therapeutic target for analgesia. *Neurobiology of Disease*. 71: 245-59, 2014
- Hori et al. Involvement of Nerve Growth Factor in Muscle Hyperalgesia in a Rat Model of Peripheral Arterial Disease. 17th world congress on Pain, PTH220, Abstract, 2018

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ishikawa Tatsuya, Murata Koshi, Okuda Hiroaki, Potapenko Iliia, Hori Kiyomi, Furuyama Takafumi, Yamamoto Ryo, Ono Munenori, Kato Nobuo, Fukazawa Yugo, Ozaki Noriyuki	4. 巻 26
2. 論文標題 Pain-related neuronal ensembles in the primary somatosensory cortex contribute to hyperalgesia and anxiety	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 106332 ~ 106332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.106332	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Okuda Hiroaki, Ishikawa Tatsuya, Hori Kiyomi, Kwankaew Nichakarn, Ozaki Noriyuki	4. 巻 162
2. 論文標題 Hedgehog signaling plays a crucial role in hyperalgesia associated with neuropathic pain in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 207 ~ 220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.15613	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kwankaew Nichakarn, Okuda Hiroaki, Aye Mon Aye, Ishikawa Tatsuya, Hori Kiyomi, Sonthi Phattarapon, Kozakai Yu, Ozaki Noriyuki	4. 巻 25
2. 論文標題 Antihypersensitivity effect of betanin (red beetroot extract) via modulation of microglial activation in a mouse model of neuropathic pain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Pain	6. 最初と最後の頁 1788 ~ 1803
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ejp.1790	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Iwata Masahiro, Inoue Takayuki, Asai Yuji, Hori Kiyomi, Fujiwara Mitsuhiro, Matsuo Shingo, Tsuchida Wakako, Suzuki Shigeyuki	4. 巻 23
2. 論文標題 The protective role of localized nitric oxide production during inflammation may be mediated by the heme oxygenase-1/carbon monoxide pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100790 ~ 100790
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2020.100790	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kozakai Yu, Hori Kiyomi, Aye-Mon Aye, Okuda Hiroaki, Harada Shin-ichi, Hayashi Koei, Ozaki Noriyuki	4. 巻 519
2. 論文標題 The role of peripheral corticotropin-releasing factor signaling in a rat model of stress-induced gastric hyperalgesia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 797 ~ 802
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.09.040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計16件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 堀 紀代美, 奥田 洋明, 石川 達也, 白石昌武, 中村恒夫, 尾崎 紀之
2. 発表標題 血管内皮増殖因子のスプライスバリエントVEGF-A165aとVEGF-A165bの量的バランスは下肢虚血に起因する筋の痛覚過敏に関与する
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 奥田 洋明, 石川 達也, 堀 紀代美, 尾崎 紀之
2. 発表標題 末梢神経系におけるhedgehogシグナルの活性化は痛覚過敏の発症に関与する
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kiyomi Hori, Hiroaki Okuda, Tatsuya Ishikawa, Yoshitake Shiraishi, Tsuneo Nakamura, Noriyuki Ozaki
2. 発表標題 Altering VEGF-A165a/VEGF-A165b balance contribute to muscle hyperalgesia in a rat model of peripheral arterial disease.
3. 学会等名 19th World Congress on Pain (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村 恒夫, 白石 昌武, 奥田 洋明, 堀 紀代美 ,石川 達也, 尾崎 紀之
2. 発表標題 Thiel法により固定された臓器の組織学的検討
3. 学会等名 日本解剖学会第81回中部支部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nichakarn Kwankaew、奥田洋明、堀紀代美、石川達也、中村恒夫、白石昌武、尾崎紀之
2. 発表標題 Antiallodynic effect of betanin (red beetroot extract) via modulation of microglial activation in a mouse model of neuropathic pain
3. 学会等名 第126回 日本解剖学会総会・全国学術集会・第98回 日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 徳田 仁志, 中村 恒夫, 白石 昌武, 石川 達也, 堀 紀代美, 奥田 洋明, 尾崎 紀之
2. 発表標題 Morphological changes in infrapatellar fat pad associated with anterior cruciate ligament injury: Ultrasonographic and quantitative dynamic assessment on Thiel embalmed cadaver.
3. 学会等名 第126回 日本解剖学会総会・全国学術集会・第98回 日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Phattarapon Sonthi, Nichkarn Kwankaew, 奥田 洋明, 堀 紀代美 ,石川 達也, 尾崎 紀之
2. 発表標題 慢性痛モデルマウスに対する植物由来抗酸化成分を用いた疼痛緩和作用の比較検討
3. 学会等名 第42回日本疼痛学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Phattarapon Sonthi, Nichkarn Kwankaew, 奥田 洋明, 堀 紀代美, 石川 達也, 尾崎 紀之
2. 発表標題 慢性痛モデルマウスに対する食物由来抗酸化成分を用いた疼痛緩和作用の比較検討
3. 学会等名 日本解剖学会第80回中部支部学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 奥田洋明、Kwankaew Nichakarn、石川達也、堀紀代美、中村恒夫、白石昌武、尾崎紀之
2. 発表標題 Hedgehogシグナル活性化は痛覚過敏の発症に関与する
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石川達也、村田航志、黒田一樹、堀紀代美、奥田洋明、尾崎紀之、深澤有吾
2. 発表標題 Na/K-ATPase 3の神経細胞膜上発現分布の定量的局在解析
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 白石昌武、中村恒夫、石川達也、堀紀代美、奥田洋明、尾崎紀之
2. 発表標題 軟口蓋へ分布する動脈の走行に関する肉眼解剖的観察
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀 紀代美, 奥田洋明, 中村恒夫, 白石昌武, 石川達也, 尾崎紀之
2. 発表標題 神経成長因子は下肢虚血に起因する筋の痛覚過敏に関与する
3. 学会等名 第79回日本解剖学会中部支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川崎悠貴, 堀 紀代美, 中村恒夫, 奥田洋明, 白石昌武, 石川達也, 尾崎紀之
2. 発表標題 膝内側側副靭帯損傷の疼痛に関する基礎的研究 –ラット膝内側側副靭帯の神経分布の観察–
3. 学会等名 第79回日本解剖学会中部支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀 紀代美, 奥田 洋明, 中村 恒夫, 白石 昌武, 石川 達也, 尾崎 紀之
2. 発表標題 虚血性疼痛における神経成長因子の関与について
3. 学会等名 第41回日本疼痛学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥田 洋明, ニチャカン クワンケー, 堀 紀代美, 石川 達也, 小酒井 友, 中村 恒夫, 白石 昌武, 尾崎 紀之
2. 発表標題 Hedgehog シグナルは痛覚過敏形成に関与する
3. 学会等名 第41回日本疼痛学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀 紀代美, 奥田 洋明, 中村 恒夫, 白石 昌武, 石川 達也, 尾崎 紀之
2. 発表標題 食用ビート成分による疼痛緩和作用の解析
3. 学会等名 第41回日本疼痛学会
4. 発表年 2019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
研究分担者	尾崎 紀之 (Ozaki Noriyuki) (40244371)	金沢大学・医学系・教授 (13301)	
研究分担者	奥田 洋明 (Okuda Hiroaki) (40453162)	金沢大学・医学系・准教授 (13301)	
研究分担者	石川 達也 (Ishikawa Tatsuya) (00750209)	金沢大学・医学系・助教 (13301)	

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
---------	---------