

令和 4 年 4 月 24 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18250

研究課題名（和文）術後痛におけるGRK2関連メカニズムの解析

研究課題名（英文）Analysis of GRK2-related mechanisms in postoperative pain

研究代表者

山北 俊介（Yamakita, Shunsuke）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：10836092

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：G蛋白質共役受容体(GPCR)キナーゼ2(GRK2)の発現調節は、GPCRおよび非GPCRシグナリングを介した過剰刺激からの保護により細胞機能を回復する。一次求心性ニューロンにおいて、GRK2は侵害受容性疼痛を負に調節する。本研究では、一次求心性ニューロンにおけるGRK2発現が組織損傷後の急性痛消退に寄与するという仮説を検証した。

IGF1によって駆動されるGRK2発現の誘導が強力な鎮痛効果を有し、組織損傷後の痛覚過敏の消退をもたらすことを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IGF1 GRK2シグナル伝達の調節不全は、急性痛消退不全、即ち手術後の慢性痛発生に潜在的につながる可能性がある。

GRK2標的薬が術後痛からの回復を促進させる可能性を提案した。

研究成果の概要（英文）：Dynamic regulation of G-protein-coupled receptor (GPCR) kinase 2 (GRK2) expression restores cellular function by protecting from overstimulation via GPCR and non-GPCR signaling. In the primary afferent neurons, GRK2 negatively regulates nociceptive tone. The present study tested the hypothesis that induction of GRK2 in the primary afferent neurons contributes to the resolution of acute pain after tissue injury.

Induction of GRK2 expression driven by tissue IGF1 has potent analgesic effects and produces resolution of hyperalgesia after tissue injury.

研究分野：疼痛

キーワード：GRK2 GPCR IGF1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

術後痛の大きさや期間は、組織損傷による一次知覚神経の感作に伴う痛覚過敏の程度により左右される。しかしながら、一次知覚神経の感作を制御する細胞内因子は同定されていない。GRK2 は GPCR をリン酸化し、その機能を制御する役割がある。一次知覚神経に発現する痛覚受容体の多くは GPCR であり、GRK2 が痛覚受容体を介して疼痛の受容を調整している可能性は高いが、組織損傷による痛覚過敏に対する GRK2 の役割はほとんど知られていない。近年の研究により、組織損傷による痛覚過敏は自然に軽快するのではなく、あらかじめプログラムされた働きに従って能動的に消退すると考えられている。

### 2. 研究の目的

急性痛から慢性痛への移行には GRK2 の機能不全が関係しているといわれている。GRK2 ノックアウトマウスでは、組織炎症によりもたらされる痛覚過敏が増強、延長する。一方、急性痛の制御と GRK2 の機能について調査した研究はこれまでに存在せず、その役割についてはほとんど知られていない。

GRK2 は GPCR をリン酸化することでその機能を制御する。一次知覚神経に発現する痛覚受容体の多くは GPCR であり、一次知覚神経の痛覚受容体の機能変化により疼痛の強さが調整されることは以前より知られていた。

GRK2 は GPCR の機能を制御しており、一次知覚神経において GRK2 が GPCR を介して痛覚伝達に影響を及ぼす可能性は高い。しかしながら、GRK2 が術後痛モデルにおける痛覚過敏の大きさや消退までの時期に与える影響は調査されたことがない。

本研究では、GRK2 が組織損傷後の急性痛の治癒を促進するという可能性を検証し、そのメカニズムを解明する。GRK2 阻害剤・感作剤の投与に伴う急性痛の大きさや消退時期の変動を明らかにすることで、GRK2 を標的とした術後急性痛の早期消退法の可能性を提示する。さらには、GRK2 が制御する GPCR を同定し、GRK2-GPCR 制御系を標的とした新たな鎮痛法を提案したい。

### 3. 研究の方法

1: GRK2 の知覚神経における発現解析

1-1: ラット後根神経節(DRG)および脊髄後角における GRK2 の発現

1-2: 足底切開モデルにおける GRK2 の発現変化

雄性 SD ラットを実験に用いる。術後痛モデルとして、Brennan らが開発した足底切開モデルを全身麻酔下に作成する。創周囲の知覚を支配する第 4・第 5 腰髄神経の後根神経節 (DRG) および脊髄を採取する。組織切片を作成し、免疫組織化学法により GRK2 陽性ニューロンを可視化する。また、ウェスタンブロッティングにより GRK2 の発現量を定量する。

2: GRK2 阻害剤・感作剤が痛覚閾値に与える影響

2-1: 阻害剤・感作剤投与による未処置ラットの痛覚閾値の変動ラットに GRK2 阻害剤・感作剤を投与し、行動解析で痛覚閾値を決定する。機械痛覚過敏は von Frey 法によって逃避閾値を測定し、熱痛覚過敏は hot plate 法を用いて逃避潜時を測定する。GRK2 阻害剤は CAS24269-96-3、GRK2 感作剤は PAOPA(ドーパミン受容体 allosteric modulator)を用いる。投与経路として末梢組織(足底)とカテーテルを用いた髄腔内投与を行う。

2-2: 阻害剤・感作剤投与による足底切開モデルの痛覚過敏の変化

ラット足底切開モデルを作成し、痛覚閾値を測定する。GRK2 阻害剤・感作剤を投与する。足底切開モデル作成後には、機械刺激に対する逃避閾値の低下と、熱刺激に対する逃避潜時の短縮が処置直後より認められ、およそ 1 週間継続する。従って、薬剤投与時期は痛覚過敏が生じている急性期(モデル作成 1 日後)と痛覚過敏が消退する回復期(モデル作成 7 日後)に行う。急性期の疼痛が抑制または増強するか、回復期に痛覚過敏が再燃するかどうかを検討し、モデル作成後の痛覚過敏の程度や継続時間に変化が生じるか明らかにする。GRK2 が GPCR を制御して痛覚過敏を抑制するならば、阻害剤の投与により痛覚過敏は過大・延長し、感作剤の投与により痛覚過敏は減弱・短縮する。

3: GRK2 が制御する GPCR の同定

3-1: 代表的な GPCR の GRK2 によるリン酸化の有無

研究 1, 2 により術後痛モデルにより足底切開モデルにおいて GRK2 が活性化される時期が明らかとなる。この時期に GRK2 阻害剤を投与したラットと投与しないラットを作成し、それぞれの DRG から採取したタンパクを用い、代表的な GPCR 痛覚受容体に対するウェスタンブロッティングを行う。GRK2 により制御を受ける受容体は GRK2 阻害剤投与群においてリン酸化の程度が減弱するはずである。一次知覚神経に発現する主な GPCR として、IGF1 受容体を調査する。

4: GRK2-GPCR シグナリング制御による鎮痛効果の検証

4-1: GPCR 痛覚受容体阻害剤による痛覚過敏抑制効果の検証

研究 3 で同定された GPCR (IGF1 受容体) は術後痛モデルの痛覚過敏に関与することが考えられる。

足底切開モデルを施したラットに同定された GPCR 拮抗薬を投与することで痛覚過敏が緩和されるかを検証する。

#### 4. 研究成果

G 蛋白質共役受容体(GPCR)キナーゼ 2(GRK2) の発現調節は、GPCR および非 GPCR シグナリングを介した過剰刺激からの保護により細胞機能を回復する。一次求心性ニューロンにおいて、GRK2 は侵害受容性疼痛を負に調節する。

本研究では、一次求心性ニューロンにおける GRK2 発現が組織損傷後の急性痛消退に寄与するという仮説を検証した。後根神経節 (DRG) における GRK2 発現を切開 1,7 日後に解析した。GRK2 阻害剤の疼痛効果を評価するため、足底切開を受けたラットにおいて、切開後 7 日目に GRK2 阻害剤の腹腔内投与を行った。また、ラット後肢にインスリン様成長因子 1(IGF1)を注射後、GRK2 発現を分析した。加えて、IGF1 受容体(IGF1R)阻害剤を足底切開ラットに投与し、切開による痛覚過敏および GRK2 発現に与える影響を検討した。

足底切開 7 日後では DRG における GRK2 は増加したが、切開 1 日後では増加しなかった。足底切開後の急性痛覚過敏は切開後 7 日までに消失した。この時点での GRK2 阻害剤の腹腔内注射は機械的痛覚過敏を発生させたが、未処置ラットでは GRK2 阻害剤投与による痛覚過敏を生じなかった。足底切開後の IGF1 発現は足底で増加したが、DRG では増加しなかった。IGF1 の足底内注射は同側の DRG における GRK2 発現を増加させた。IGF1R 阻害剤投与は足底切開後の痛覚過敏消退と GRK2 発現の両方を予防した。

これらの知見は IGF1 によって駆動される GRK2 発現の誘導が強力な鎮痛効果を有し、組織損傷後の痛覚過敏の消退をもたらすことを実証した。IGF1 GRK2 シグナル伝達の調節不全は、急性痛消退不全、即ち手術後の慢性痛発生に潜在的につながる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 佐和 貞治, 山北 俊介, 小川 寛	4. 巻 128
2. 論文標題 京都府立医科大学附属病院の麻酔科管理手術：患者高齢化と体格指数の分析	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 京都府立医科大学雑誌	6. 最初と最後の頁 701 ~ 708
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.32206/jkpum.128.10.701	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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