

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23791689

研究課題名（和文） CRPS におけるアクアポリン 1 の役割について

研究課題名（英文） Elucidation of the role of aquaporin 1 in CRPS

研究代表者 Petrenko Andrey (Petrenko Andrey)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：30397153

研究成果の概要（和文）：水チャネルである AQP1 は浮腫形成と痛みの両方に関与している。浮腫や痛みは慢性疼痛症候群の一つである CRPS の特徴である。本研究は、AQP1 が CRPS のメカニズムに関与しているかどうかを調べるために行われた。野生型マウスに虚血後慢性疼痛 (CPIP) モデルを与え、浮腫および痛覚過敏の発生における AQP1 の役割を調べた。そのために、AQP1 機能の阻害剤であるアセタゾラミド(AZA)を用いた薬理学的アプローチを用いた。AZA 群のマウスでは、CPIP 作成日の前日から、28 日間の観察期間に渡って毎日 AZA の投与を行った。しかし、AZA の投与は浮腫の程度やその減り具合に影響を及ぼさなかった。また、28 日の観察期間中に行われた機械的および熱刺激による感覚アッセイにおいても AQP1 阻害剤投与による痛みの改善効果も見られなかった。この結果から、AQP は虚血再灌流傷害後の浮腫形成および痛覚過敏症の発症に関与している可能性は低いことが示唆された。また、CRPS の薬理学的管理のために AQP1 以外のターゲットを探るべきことも示唆された。

研究成果の概要（英文）：AQP1 water channel is involved in both edema formation and pain. Edema and pain are hallmarks of CRPS I, a debilitating chronic pain condition that can develop in 10-20% of patients following fractures or other similar injuries. This study was undertaken to find out if AQP1 protein is involved in the mechanism of CRPS. We investigated the role of AQP1 in the development of edema and hypersensitivity in CPIP model. A pharmacological approach that used acetazolamide, an inhibitor of AQP1 function was used. Mice that underwent CPIP procedure were given acetazolamide beginning the day before the injury and continuing for the observation period of 28 days. As we showed, acetazolamide had no effect on the extent of edema and the time course of its resolution following the reperfusion. Also, no differences in pain thresholds were found in mice receiving AQP1 inhibitor in mechanical and thermal sensory assays performed during 28-day postreperfusion period. Our results indicate that AQP is unlikely to be involved in the edema formation following ischemia-reperfusion injury. It is also unlikely to be involved in the development of pain hypersensitivity following such injury. They also suggest that targets other than AQP1 should be looked for pharmacological management of CRPS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：アクアポリン1、CRPS、虚血後慢性疼痛モデル

1. 研究開始当初の背景

複合性局所疼痛症候群 I 型 (CRPS) は関節捻挫や骨折などの深部組織の外傷を伴う慢性疼痛状態である。CRPS では一方は炎症と浮腫、もう一方は痛みの感受性が増強している状態が主な病理学的な原因要素と考えられている。

アクアポリン 1 (AQP1) は水チャネルでありながら、近年の研究によって浮腫だけでなく、侵害受容にも関与していることがわかった。血管において AQP1 の発現は虚血と炎症によって引き起こされる。また、神経組織においても AQP1 の発現は外傷や虚血によって増強される。私は AQP1 が血管性及び神経性、または両方が CRPS の病理学的なメカニズムに関与しているだろうという仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、複合性局所疼痛症候群 (CRPS) の実験モデルを作成し、CRPS の病理学的な機序における AQP1 の関与を確認し新しい治療法を提案することである。

3. 研究の方法

(1) 虚血後慢性疼痛モデル Chronic post-ischemia pain (CPIP) model: Coderre らの手順 (Pain, 2004 年) に従って、セボフルラン麻酔下で行う。麻酔ガスモニター (V9400、SurgiVet, Inc) を用い連続的に麻酔薬の濃度をモニターする。麻酔導入後マウスの左足首

関節に硬いゴムの O リング (図 1) をつけ、3 時間絞った状態にする。



図 1. オリジナル CPIP モデルに用いられる O リング。

Sham マウスには麻酔をかけるが、O リングをつけない。再還流後の 2-4 時間にわたって虚血性傷害を与えた後肢に充血、浮腫などが見られる。さらに、自発性疼痛関連行動 (足の shaking, licking, favoring など) 及び痛覚過敏が見られ、後者は早くても再還流の 8 時間後に出現し、4 週間位続く。

(2) 後肢の容積: 後肢の容積は足容積測定装置 (MK-101PM、室町機械) を用い、水の置換法によって測定する。充血は CPIP 前、再還流 5、30 分、2、4 時間後に後肢足底の温度の測定によって評価する。

後肢の直径: CPIP 前、再灌流 15、30 分、1、2、3、4 時間後、そして観察期間中に逃避反応を評価すると同時に、後肢の直径をマイクロメーターで測り、浮腫の程度を評価する。

(3) 両後肢の熱・機械的刺激に対する逃避反応を 2%セボフルラン鎮静下で虚血前及び虚血・再還流 4、24、72 時間後に評価し、再灌流後の 1 ヶ月まで週 2 回評価する。

熱刺激 Plantar test: Hargreaves 法により、マウスの後肢足底に赤外線熱刺激を与え、足を振り回す(flinching)までの withdrawal latency を測定する。

機械的刺激 Randall-Selitto test: Randall Selitto 法により、デジタル・ランドセルット式鎮痛効果測定装置 (MK-201D、室町機械) でマウスの後肢に一定の速度で連続的に増加する圧を与え、逃避閾値を測定する。

(4) 薬剤処理: AQP1 阻害薬 (セタゾールアミド、AZA 等) を再還流の前日から一週間にならって連日皮下投与する。対象群のマウスには阻害薬の媒体を投与する。

4. 研究成果

AQP1 阻害薬を投与する前に、比較対象となるコントロール C57BL/6 マウスに CPIP モデルを作成し、血流再開後の経過観察の必要があった。

足の血流を閉鎖させるために内径の異なる O-リングを試した。1.42mm のリングが一番強い浮腫を起こした (図 2)。

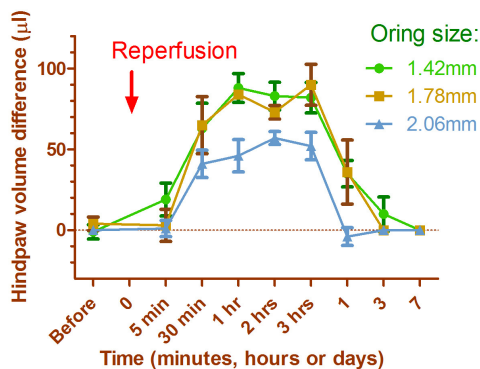


図 2. オリジナル CPIP モデルにおける後肢の容積の変動。

浮腫は血流再開後 3 日までに改善したが、過去の実験動物の報告と対比的に、C57BL/6 マウスでは虚血後には痛みが生じなかった。むしろリングを付けることによって足の感覚喪失が現れ、それは虚血 1 週間後に徐々に回復し始めた (図 3, 4)。

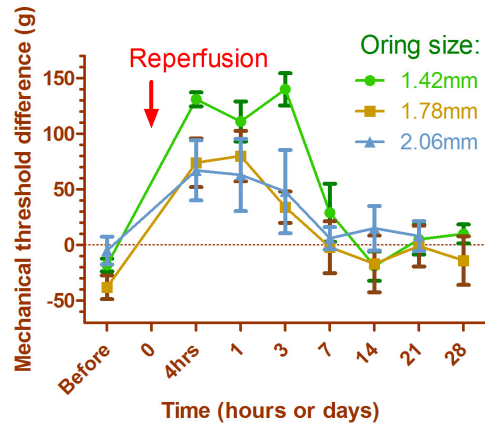


図 3. オリジナル CPIP モデルにおける機械的刺激に対する後肢の痛み閾値の変動。

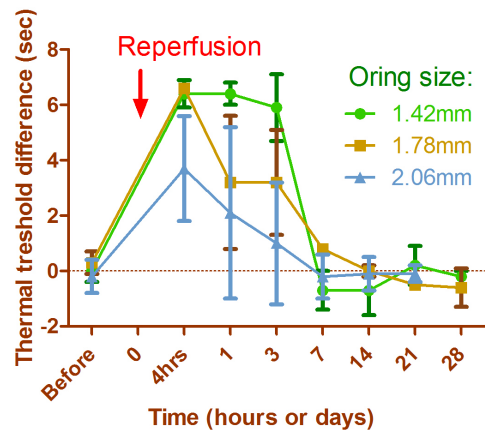


図 4. オリジナル CPIP モデルにおける熱刺激に対する後肢の痛み閾値の変動。

その感覚障害は圧挫損傷の神経支配領域で見られる感覚喪失・回復と似たような症状だった。さらに、ラットと違って、C57BL/6 マウスには感覚が戻った後に痛みが認められなかった。この問題を解決するためにより大

きいリングを試してみた。しかし、より大きいリングの装着によって虚血後の浮腫の程度が減少し、感覚喪失も和らいだが完全に避けることができなかった。痛みも発生しなかった。2.06mmより大きいリングによって完全血流閉鎖ができず、浮腫も見られなかった。CPIP モデルにより疼痛が生じなかった結果からその原型のモデルは C57BL/6 マウスに適應していない事が分かった。

したがって、既存のモデルを変更する必要があった。そのためにマウス大腿に空気圧カフの装着による血流遮断を試みた (図5)。



図5. 改変された CPIP モデルにおける空気圧カフ装着の実例。

そうすることによって神経損傷を軽減することができ、再灌流後に感覚のテストも問題なく行えた。その後、野生型マウスに改変された CPIP モデルを与え、浮腫および痛覚過敏の発生における AQP1 の役割を調べた。そのために、AQP1 機能の阻害剤であるアセタゾラミド(AZA)を用いた薬理的アプローチを用いた。AZA 群のマウスでは、CPIP 作成日の前日から、28日間の観察期間に渡って毎日 AZA の投与を行った。しかし、AZA の投与は浮腫の程度やその減り具合に影響を及ぼさなかった (図6)。

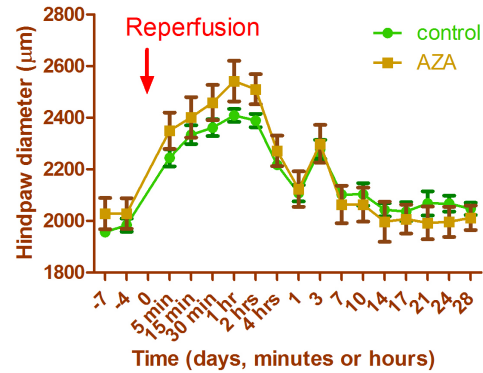


図6. 改変された CPIP モデルにおける後肢の直径の変動。Control と AZA はそれぞれ対照群とアセタゾールアミドの投与を受けた動物を意味する。

また、28日の観察期間中に行われた機械的および熱刺激による感覚アッセイにおいても AQP1 阻害剤投与による痛みの改善効果も見られなかった (図7, 8)。

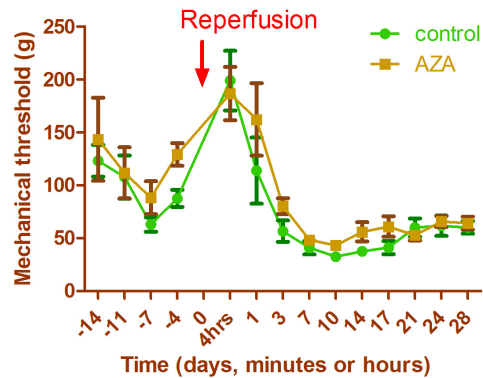


図7. 改変された CPIP モデルにおける機械的刺激に対する後肢の痛み閾値の変動。Control と AZA はそれぞれ対照群とアセタゾールアミドの投与を受けた動物を意味する。

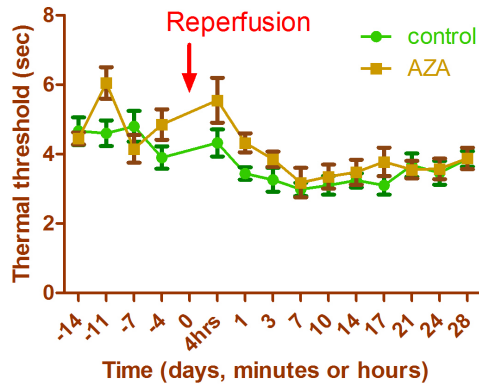


図 8. 改変された CPIP モデルにおける熱刺激に対する後肢の痛み閾値の変動。Control と AZA はそれぞれ対照群とアセタゾールアミドの投与を受けた動物を意味する。

この結果から、AQP は虚血再灌流傷害後の浮腫形成および痛覚過敏症の発症に関与している可能性は低いことが示唆された。また、CRPS の薬理学的管理のために AQP1 以外のターゲットを探るべきことも示唆された。その目的を達するために改変された CPIP モデルは一つの大事な実験ツールになるだろう。

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 2 件)

(1) Petrenko Andrey ほか、「Increased brain monoaminergic tone after the NMDA receptor GluN2A subunit gene knockout is responsible for resistance to the hypnotic effect of nitrous oxide」、*Eur J Pharmacol*、査読有、698 巻、2013 年、200-205 頁。

(2) Ishii Hideaki, Petrenko Andrey ほか、「No evidence for the development of acute analgesic effects during and hyperalgesia after prolonged remifentanyl administration in mice」、*Mol Pain*、査読有、9 巻、2013 年。doi:10.1186/1744-8069-9-11。

[学会発表] (計 2 件)

(1) Petrenko Andrey、「虚血また神経損傷による CRPS の動物モデルの作成について」、第 76 回新潟麻酔懇話会/第 55 回新潟ショックと蘇生・集中治療研究会、平成 24 年 (2012)

年 12 月 01 日、新潟。

(2) Petrenko Andrey、「虚血による CRPS の動物モデルの作成について」、第 75 回新潟麻酔懇話会/第 54 回新潟ショックと蘇生・集中治療研究会、平成 24 年 (2012) 年 06 月 02 日、新潟。

6. 研究組織

(1)研究代表者

Petrenko Andrey (Petrenko Andrey)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：30397153

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

