

論文内容の要旨

論文提出者氏名 松田 愛

論文題目 Acquired exchange protein directly activated by cyclic adenosine monophosphate activity induced by p38 mitogen-activated protein kinase in primary afferent neurons contributes to sustaining postincisional nociception

論文内容の要旨

【背景】手術後患者の10-50%において、創部の痛みが術後数ヶ月から数年にわたり遷延することが知られている。遷延性術後痛は患者の心理的負担を重くし、術後回復を妨げ、長期の疼痛治療をもたらすことで患者の生活の質を著しく損なう。しかし、術後急性痛が慢性化し遷延するメカニズムは十分に解明されておらず、有効な治療法は確立できていない。

術後痛のプレクリニカルモデルである足底切開モデルにおいて、痛みが慢性化するメカニズムの一つとして痛覚プライミングという現象が注目されている。これは、足底切開を施したラットにおいて、足底切開直後の急性痛が消失した後に発痛物質であるプロスタグランジン E₂ (PGE₂) を投与すると、PGE₂ による痛覚過敏が足底切開を受けないラットよりも遷延する現象で、一次知覚神経での細胞内シグナルの変化が関与する。exchange protein directly activated by cAMP (EPAC) は環状アデノシンリン酸 (cAMP) と結合するシグナル蛋白で、EPAC1 と EPAC2 の2種類のサブタイプが存在し、様々な慢性痛モデルにおいて痛覚過敏発症に関与する。本研究の目的は、足底切開モデルにおける痛覚プライミングが一次知覚神経における EPAC の発現変化により生じるとの仮説を検証し、EPAC の発現変化を引き起こす背景として p38 MAP キナーゼ (p38 MAPK) の関与を明らかにすることである。

【方法】雄性 Sprague-Dawley ラットを用い、足底を1 cm 切開して足底筋を挫滅後に縫合する足底切開モデルを作成した。痛覚プライミングは足底切開14-21日後に PGE₂ を足底投与し、行動解析により痛覚過敏の遷延を確認した。未処置ラットおよび足底切開14日後のラットの第5腰椎後根神経節(L5-DRG)における EPAC1・EPAC2 の発現を免疫組織化学法、免疫プロット法にて検討した。また、選択的 EPAC 阻害剤 ESI-09 を足底切開14日後の PGE₂ 投与2時間前に足底投与し、PGE₂ による痛覚過敏の延長が予防できるかを検証した。さらに、足底切開後に一次知覚神経において活性化される p38 MAPK が痛覚プライミングおよび EPAC の発現に及ぼす影響について、選択的 p38 MAPK 阻害剤 FR167653 を足底切開時に腹腔内投与し、14日後に痛覚過敏について行動解析を行い、また L5-DRG での EPAC1・EPAC2 の発現について免疫組織化学法を用いて調べた。

【結果】足底切開を受けたラットではモデル作成直後には機械刺激に対する著明な閾値低下を示したが、作成14日後には痛覚過敏は消失した。足底切開14-21日後に PGE₂ を足底投与すると、未処置群では PGE₂ による痛覚過敏は8時間以内で消退したのに対し、足底切開

群では7日間以上にわたり遷延し、足底切開による痛覚プライミングが確認された。

免疫組織化学法では、未処置群の L5-DRG において EPAC1・EPAC2 は一部の神経細胞の細胞体を中心に発現がみられ、全体の細胞における EPAC1・EPAC2 陽性細胞の割合は、8%、6%であったのに対し、足底切開14日後では21%、20%と増加していた。画像解析では、足底切開により EPAC1・EPAC2 シグナルの強い細胞が有意に増加しており、直径 800 μ m² 以下の小型細胞を中心に発現していた。また、痛みを伝達するC繊維のマーカー isolectin B4 (IB4) との二重染色では、IB4 陽性細胞での EPAC1・EPAC2 陽性細胞の割合はそれぞれ72%、68%であった。免疫プロット法においても、足底切開により EPAC1・EPAC2 の発現増加が確認された。

足底切開14日後の PGE₂ 投与前に ESI-09 を投与した群では、PGE₂ による痛覚過敏の遷延が有意に抑制された。一方で、足底切開2時間前に ESI-09 を足底投与したところ、足底切開による急性痛に対する抑制効果はみられず、足底切開24時間後の痛覚過敏に対しても抑制効果は認めなかった。足底切開時に FR167653 を腹腔内投与した群では、14日後の PGE₂ による痛覚過敏の遷延が有意に抑制された。また免疫組織化学法では、FR167653 投与群で足底切開14日後の L5-DRG における EPAC1・EPAC2 陽性細胞の割合が有意に抑制された。

【考察】本研究では、足底切開モデルにおいて、術後14-21日間にわたり痛覚過敏が遷延する(痛覚プライミング)ことを明らかにした。足底切開モデルでは末梢神経の切断や結紮は行わないため、神経が損傷しなくても痛覚過敏は遷延しうることが示されたといえる。このことは、手術手技による神経損傷が明らかでない患者にも遷延性術後痛が発症するという臨床的な指摘とよく一致し、遷延性術後痛の新しいメカニズムの存在を示唆している。

EPAC は一次知覚神経において cAMP により活性化され、プロテインキナーゼ C ϵ (PKC ϵ) を介して痛覚過敏の慢性化に関与するとされている。本研究では、足底切開14日後に一次知覚神経における EPAC1・EPAC2 の発現が著明に増加すること、特に IB4 陽性細胞に多く発現することを確認した。痛覚プライミングは一次知覚神経の IB4 陽性細胞により引き起こされるとされており、EPAC の発現増加は痛覚プライミングの発現時期に一致して、同一の細胞に誘導されることが示された。さらに、われわれは EPAC の選択的阻害剤 ESI-09 が痛覚プライミングを抑制することを明らかにした。同量の ESI-09 は足底切開後の急性痛には効果がなかったことから、EPAC は痛みの慢性化に特化した役割を担っていると考えられる。

組織が損傷を受けると、一次知覚神経において p38 MAPK のリン酸化が生じ、遺伝子発現を変化させることで痛覚過敏を引き起こす。本研究の結果、選択的 p38 MAPK 阻害剤の投与が足底切開後の痛覚プライミングと EPAC 発現増加を予防することが示された。すなわち、組織損傷により活性化される一次知覚神経の p38 MAPK が EPAC1・EPAC2 の発現を介して痛覚プライミングを誘導することが明らかとなった。

【結語】遷延性術後痛モデルにおいて一次知覚神経における p38 MAPK に誘導される EPAC の活性化が重要な役割を担うことを明らかにした。p38 MAPK と EPAC が遷延性術後痛の新しい治療ターゲットになりうると示した点において、本研究の医学的価値は高いと考える。