

主論文の要旨

**TRPV1 and TRPV4 play pivotal roles
in delayed onset muscle soreness**

〔 TRPV1 ならびに TRPV4 は、遅発性筋痛において
重要な役割を担っている 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻
器官系機能調節学講座 神経性調節学分野

(指導：山中 章弘 教授)

太田 大樹

【諸言】

遅発性筋痛 (DOMS) は、伸張性収縮 (LC) を含んだ慣れない激しい運動後、1～2 日遅れて生じる圧痛や運動時痛を特徴とする。しかし、なぜ遅れて起こるのかは不明であった。最近、LC をラットに負荷すると、ブラジキニン様物質の遊離とシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) の発現上昇を介して、神経成長因子 (NGF) やグリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) が発現上昇すること、両者はともに筋細径線維受容器を感作し、筋機械痛覚過敏を引き起こすことが報告された (Murase et al., 2010, 2013)。

本研究の目的は、TRPV1 ならびに TRPV4 が DOMS 発症に関与するかどうかを、それぞれのノックアウトマウスを用いて調べ、さらに両チャンネルが NGF または GDNF の下流経路、上流経路のいずれに関与するかを明らかにすることである。

【対象及び方法】

野生型マウス (WT)、TRPV1 ノックアウトマウス (TRPV1^{-/-})、TRPV4 ノックアウトマウス (TRPV4^{-/-}) を使用した。ノックアウトマウスはいずれも生理学研究所より譲渡された。すべての実験は、名古屋大学、中部大学、ならびに生理学研究所の実験動物倫理委員会の許可のもとに行った。

マウスの深部組織の機械逃避反応閾値は Randall-Selitto 測定装置 (刺激子先端径 : 2.6 mm) により、表面皮膚の逃避閾値は von Frey 毛 (VFH, 先端径 : 0.25 mm) により評価した。Randall-Selitto 法 (RST) が皮膚痛覚過敏状態においても深部組織の痛覚閾値を評価できることを明らかにするため、カラゲニン筋注 (3%, 40 μ l) により炎症を誘発し、EMLA クリーム塗布により表面麻酔を行って調べた。

DOMS 誘発のために、腓腹筋外側頭に対し LC を 300 回負荷した。また NGF (0.8 μ M, 5 μ l)、GDNF (0.03 μ M, 5 μ l) の筋注を実施し、痛覚過敏が生じるか調べた。

LC を負荷した腓腹筋外側頭を LC 後一定時間間隔で取出し、NGF、GDNF、COX-2 mRNA の発現レベル変化をリアルタイム PCR 法により評価した。用いた増幅プライマーは、NGF- β -F: 5'-CCTCCAATCCTGTTGAGAGTG-3'、NGF- β -R: 5'-TGTGAGTCGTGGTGCAGTATG-3'、COX-2-F: 5'-CCTGCTGCCCGACACCTTCA-3'、COX-2-R: 5'-AGCAACCCGGCCAGCAATCT-3'、GDNF-F: 5'-CCAGAGAATTCAGAGGGA AAGGT-3'、GDNF-R: 5'-TCAGTTCCTCCTTGGTTTCGTAGC-3'、 β -actin-F: 5'-CCA TCCTGGCCTCACTGT-3'、 β -actin-R: 5'-CCGGACTCATCGTACTCCTG-3'であった。さらに、DOMS に対する TRPV4 の関与を薬理的にも調べるため、TRPV4 アンタゴニスト (HC-067047 : 10, 100 mg/kg, 10 μ l) を同筋に筋注した。

【結果】

RST によりマウスの深部組織の逃避反応閾値の測定が可能であることが分かった (図 1)。マウス用に改変した LC 負荷装置を用いて LC を負荷し、DOMS (筋機械痛覚過敏) が生じることを確認した (図 2)。DOMS 発生の有無を遺伝子型で比較したところ、TRPV1^{-/-}、TRPV4^{-/-}では生じなかった (図 3A)。また、WT において TRPV4

アンタゴニストが、低下した逃避閾値を回復することを明らかにした (図 3B)。NGF mRNA の発現レベルは WT では LC3 時間後に有意に上昇した。TRPV1^{-/-}、TRPV4^{-/-}でも WT と同様の NGF mRNA 発現上昇が見られた (図 4)。NGF 筋注により、WT と TRPV4^{-/-}では逃避閾値が有意に低下したが、TRPV1^{-/-}では低下しなかった (図 5)。LC 3 時間後の COX-2 mRNA 増大は 3 遺伝子型間に差がなかった (図 6A, B) が、GDNF mRNA の LC3 時間後の上昇は TRPV4^{-/-}ではみられなかった (図 6C, D)。

また、WT における LC による GDNF mRNA 発現増大に TRPV4 アンタゴニストは影響を与えなかった (図 6E)。GDNF を筋注したところ、WT では機械逃避閾値が有意に低下したが、TRPV1^{-/-}、TRPV4^{-/-}では低下しなかった (図 7)。

【考察】

機械痛覚過敏における TRPV1、TRPV4 と NGF の関係について

TRPV1、TRPV4 いずれも運動負荷後の筋機械痛覚過敏に関係していることが示唆された。NGF 発現は両遺伝子型でも WT と差がなかったことから、NGF 発現上昇を起こす経路には関与していないと考えられる。NGF による機械痛覚過敏は TRPV1^{-/-}では生じなかったので、侵害受容器に発現する TRPV1 が DOMS において NGF によって感作されていると推定された。TRPV1 が機械応答を持つとする報告はないが、内因性の TRPV1 アゴニストの発現や、TRPV1 と機械感受性トランスデューサーとの複合体形成を介して DOMS 時の機械痛覚過敏に関与している可能性が考えられる。一方、TRPV4 は、NGF による痛覚過敏には関与していないと考えられる。

COX-2-GDNF 経路と TRPV1、TRPV4 の関係について

TRPV1^{-/-}、TRPV4^{-/-}において、COX-2 mRNA レベルは WT と差が見られなかったため、TRPV1、TRPV4 はいずれも COX-2 mRNA 発現の上流には関わらないことが示唆された。一方で、GDNF mRNA は TRPV4^{-/-}では有意な上昇がみられなかった。しかし、LC の前後の TRPV4 アンタゴニスト投与は、GDNF mRNA レベルを変化させなかった。2 つの実験結果が異なる理由の 1 つの可能性として、同アンタゴニストの TRPV4 上の作用部位が GDNF 発現に関わっている TRPV4 の部位とは別であることが考えられた。この点も含め TRPV4 の GDNF 発現への関与については今後の検討が必要である。

GDNF による痛覚過敏は TRPV4^{-/-}では見られなかったため、TRPV4 は GDNF の下流に、つまり侵害受容器上にあつて GDNF で感作されて痛覚過敏を生じていると考えられる。また、TRPV1^{-/-}でも GDNF 筋注で機械痛覚過敏を認めなかったことから、TRPV1 も GDNF を介した機械痛覚過敏に関与していることが示唆された。しかし、ラットにおける先行研究において、GDNF 筋注後の痛覚過敏は TRPV1 アンタゴニストの局所投与で抑制されなかった。この差は、種の違いによる可能性と、TRPV1 の中枢作用が考えられ、末梢への作用については今後の検討が必要である。

【結語】

マウス用に改変した RS 装置ならびに LC 機器を用い、マウス腓腹筋に DOMS を発生させることが可能となった。TRPV1 は NGF 下流経路において活性化され、TRPV4 は GDNF の下流で活性化され、DOMS の発生に寄与していると考えられる。さらに、TRPV4 は GDNF 産生経路にも関与している可能性が示唆された。